

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

PAR

Edmond BUJADOUX

Diplômé de Microbiologie

Lauréat de la Faculté

Préparateur de Microbiologie

Né le 19 Décembre 1913, à Lupersat (Creuse)

Étude de la Dissociation bactérienne chez *Bacillus lactis niger* Gorini 1894

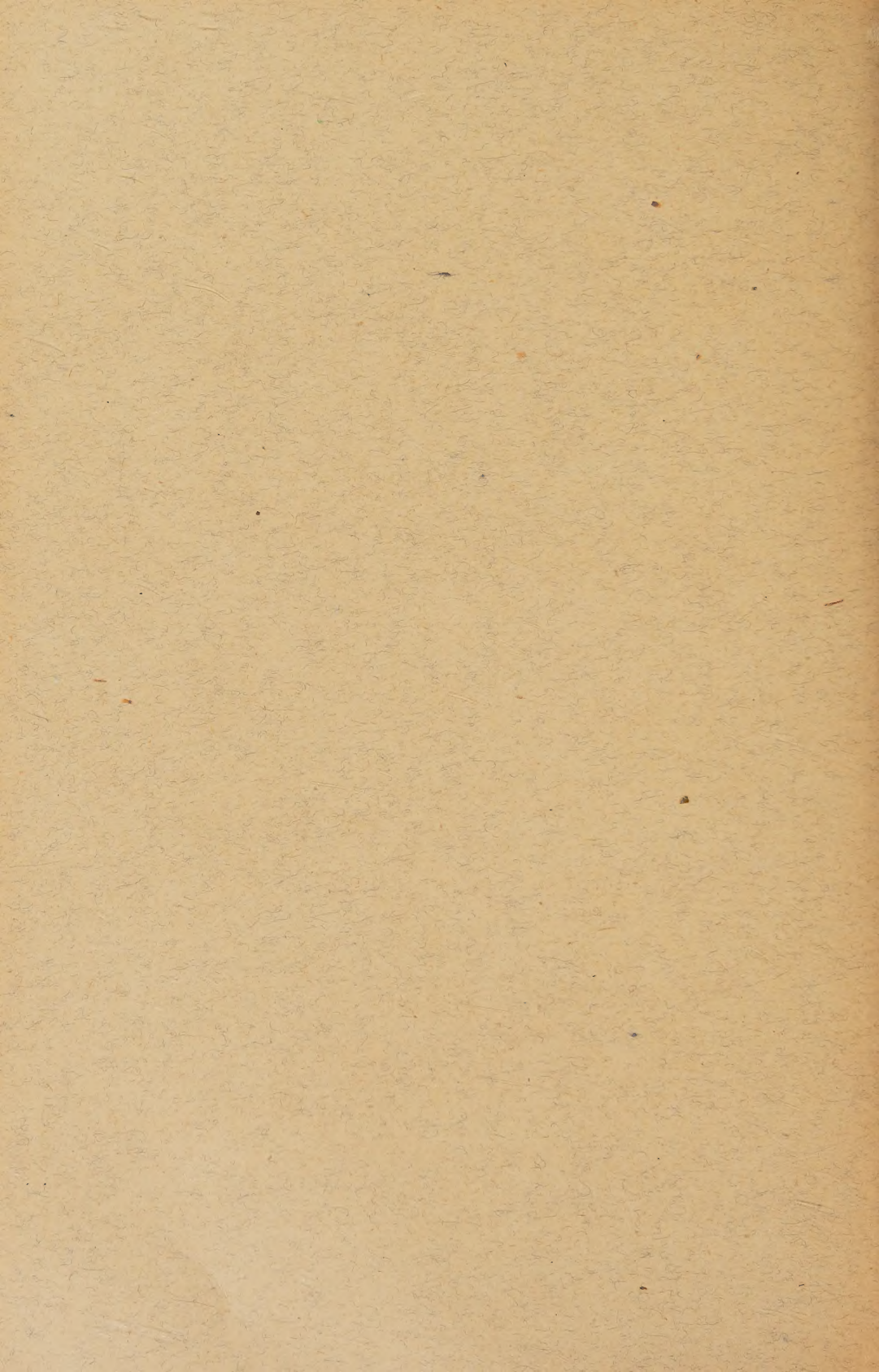
Soutenue le **17 JUIN 1939** devant la Commission d'Examen

Président.....	MM. LASSEUR.
Juges.....	{ MARCHAL.
	{ VERNIER.

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1939





Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

PAR

BUJADOUX Edmond

Diplômé de Microbiologie

Lauréat de la Faculté

Préparateur de Microbiologie

Né le 19 Décembre 1913, à Lupersat (Creuse)

Étude de la Dissociation bactérienne chez *Bacillus lactis niger* Gorini 1894

Soutenue le _____, devant la Commission d'Examen

Président.....	MM. LASSEUR.
Juges.....	{ MARCHAL.
	{ VERNIER.

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
1939

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen:

M. F. KAYSER

Assesseur:

M. A. MEUNIER

Doyens honoraires:

M. BRUNTZ, C ☼, ☼, I ☼, O ☼, ✚, ✚, Recteur de l'Université de Nancy.
 M. SEYOT, ☼, ☼, I ☼, ☼, ✚, Professeur d'Histoire naturelle

Professeurs honoraires:

M. GRÉLOT, ☼, I ☼, ☼.
 M. BRUNTZ, C ☼, ☼, I ☼, O ☼, ✚, ✚.

Professeurs:

MM. DOURIS, I ☼, ☼, ✚ Toxicologie.
 PASTUREAU, O ☼, I ☼, ✚ ... Pharmacie chimique.
 SEYOT, ☼, ☼, I ☼, ☼, ✚ Histoire naturelle.
 LASSEUR, ☼, I ☼, ☼ Microbiologie.
 MEUNIER Pharmacie galénique.
 Mlle M.-Th. FRANÇOIS Matière médicale.
 M. KAYSER Chimie.

Maître de Conférences

M. MARCHAL Sciences naturelles.

Agrégé libre:

M. GIRARDET, ☼, I ☼ Chimie et Toxicologie

Chargés de cours:

M. SEYOT, ☼, ☼, I ☼, ☼, ✚, Pr. Cryptogamie.
 Mlle M.-Th. FRANÇOIS, professeur.. Hygiène.
 MM. KAYSER, professeur Chimie minérale.
 DONZELOT, ☼, Pr Fac. Sciences Physique.
 SIMONNET, I ☼, Pr Fac. Droit. Déontologie.
 MARCHAL, maître de conférences. Hydrologie.
 VERNIER, I ☼. Zoologie.
 CORDEBARD, ☼, ☼, I ☼ Analyse chimique.
 STEIMETZ, ☼ Minéralogie.
 RICHARD Chimie organique.

**Chefs de travaux:**

MM. VERNIER, I ☼ Microbiologie et Parasitologie.
 CORDEBARD, ☼, ☼, I ☼ ... Chimie et Analyse chimique.
 STEIMETZ, ☼ Micrographie.
 DONZELOT, ☼ (chargé de trav.). Physique.
 RICHARD (chargé de travaux) ... Pharmacie.
 BAILLY (chargé de travaux) Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat:

M. TRIBOLET, I ☼ Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ni les approuver ni les imputer.

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LASSEUR

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

INTRODUCTION

Dans ce mémoire, je n'ai pas la prétention de faire l'historique de la dissociation qui, on le sait, a été l'objet de nombreuses publications, et ce serait sortir du cadre de ce travail que de tenter une étude détaillée des recherches de BEIJERINCK (1912), TËNNIESSEN (1914), LEHMANN (1916), CHODAT (1926), HADLEY (1927), GOTSCHLICH (1927), RIPPEL (1929), etc...

Au cours d'une longue carrière scientifique, qui fut toujours heureuse et fructueuse, BEIJERINCK a été préoccupé par la variabilité des Bactéries.

De même E. DUCLAUX (1898) constate que, dès que la Bactériologie fut sortie de l'ère des tâtonnements, on s'aperçut rapidement qu'il était impossible de caractériser une espèce microbienne par « *un petit nombre de propriétés assez nettes et assez constantes* ».

A cette époque, le concept « *d'être vivant* » était tellement lié à l'idée de classification, que les faits observés en Bactériologie paraissaient déroger aux règles admises; aussi ne tarda-t-on pas à voir les savants se diviser en deux camps: les Créationnistes et les Transformistes (1).

Au premier Congrès international de l'Association des Microbiologistes de langue française, la notion de variabilité a fait l'objet de discussions très serrées et nous ne pouvons faire autrement que de rapporter la conception d'un savant hollandais J.-J. VAN HOGHEM pour qui le terme de mutation est souvent employé à tort par les Bactériologistes. L'éminent Microbiologiste rappelle qu'il a un certain droit à attirer l'attention du Congrès sur cette question. « La notion de « mutation » est d'origine néerlandaise: Hugo DE VRIES l'a conçue pour indiquer la naissance d'une nouvelle espèce, c'est-à-dire un changement dans la constitution génotypique.

Nous sommes bien sûrs que les variations bactériennes que nous observons journellement dans notre laboratoire... ne sont que des adaptations... « Il est nécessaire que les Bactériologistes se rendent mieux compte que les variations bactériennes, appartiennent, au domaine de la physiologie bactérienne » (J.-J. VAN HOGHEM, octobre 1938).

C'est ainsi que COHN (1875) affirme l'existence de l'espèce bactérienne, tandis que NÆGELI (1877-78) nie cette existence.

La guerre de 1914 prouva que les types *Colibacille*: le *Bacille typhique*, les *Bacilles paratyphiques*, les *Bacilles dysentériques* et les *Pneumocoques* montraient une variabilité que l'on n'avait pas soupçonnée jusqu'alors.

Depuis longtemps, les Bactériologistes se heurtaient à une grosse difficulté lorsqu'il s'agissait d'étudier les colonies d'une espèce microbienne donnée.

Ainsi, on admettait volontiers que le *Colibacille* et les *Bacilles paratyphiques* donnaient, à côté de colonies transparentes, des colonies opaques.

Cette découverte fut approfondie et étendue à un grand nombre de germes sous le nom de « *Dissociation microbienne* » au sens de C. GORINI qui en 1902, avait déjà remarqué des variations physiologiques chez certains Cocci de la flore mammaire, au sens de ARKWRIGHT (1921), ARKWRIGHT et GOYLE (1924), DE KRUIF (1926), HADLEY (1927).

On fut ainsi conduit à admettre qu'une culture pure pouvait donner 2 types de colonies, par exemple, les colonies R grenues ou plissées et les colonies S à surface entièrement lisse.

Mais certains savants objectèrent que l'aspect des colonies pouvait être fonction du régime nutritif.

Dans une certaine mesure le fait est exact, cependant cette constatation n'infirme nullement l'existence des types R et S. Pour les observer directement, il suffit de se placer dans des conditions rigoureusement définies.

Si le milieu peut permettre la transformation d'une colonie R en colonie S ou inversement, on conçoit que d'autres facteurs tels que le temps et de même les radiations cosmiques au sens de TCHJEVSKY (1938), puissent permettre la réversibilité d'un type en un autre (1).

Certains Naturalistes ne conçoivent pas la réalité de types extrêmes sans admettre l'existence types moyens, aussi ne sera-t-on pas étonné si des savants et non des moindres, tels que PETRAGNANI (1932) et BUONOMINI (1933) ont mis en évidence l'existence de types intermédiaires figurés dans le schéma :

$$R \rightarrow R_s \rightarrow RS \rightarrow rS \rightarrow S.$$

Je ne puis pas citer tous les savants qui ont consacré leurs efforts aux Bactéries, mais il m'est impossible de passer sous silence le cours inau-

(1) A ce propos TCHJEVSKY estime que, pour préserver les cultures de l'action des rayons cosmiques, il faudrait avoir recours à des boîtes de plomb d'une épaisseur de 12 mm, 25,

gural de M. le Professeur Albert ROUSLACROIX (1), à Marseille, le 5 mars 1938.

A priori, il est impossible de comparer la « culture de collection » qui a subi un chiffre assez élevé de passages sur milieu non organisé avec la culture récemment isolée de l'organisme.

C'est ainsi que tout le monde admet des différences notables entre le *Bacille typhique* isolé par hémoculture depuis 24 à 48 heures et le germe qui provient, soit de la Collection de l'« Institut Pasteur », soit de la « National Collection » de Londres.

P. HAUDUROY, [qui, en collaboration avec Achille URBAIN, G. EHRINGER, G. GUILLOT, et J. MAGROU a rédigé un « Dictionnaire des Bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes » (1937)], pense que l'on ne peut pas comparer les germes « frais » aux « germes de collection » (1938).

Nous trouvons une vérification de son hypothèse dans le fait suivant : le *Bacille typhique* fraîchement isolé est difficilement agglutinable, alors qu'il le devient après quelques passages sur gélose ou sur bouillon. De même les *Colibacilles* perdent la propriété de donner de l'Indol lorsqu'ils se développent dans un milieu additionné d'acide phénique. Outre cette modification physiologique on observe une diminution de la taille des plastides.



J'ai essayé de caractériser les trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI à l'aide des caractères suivants :

- 1° Dimensions de la Plastide (longueur et largeur);
- 2° Méthode de Gram. Vitesse de décoloration par l'alcool;
- 3° Sporulation et germination. Colorations vitales (fuchsine formolée);
- 4° Peptisation du lait;
- 5° Protéolyse de la gélatine;
- 6° Action de différents pH;
- 7° Action de quelques antiseptiques : phénol, sulfate de cuivre;

(1) HAUDUROY arrive à des conclusions du même ordre dans la *Presse Médicale* du 18 juin 1938, n° 49.

- 8° Modifications de la tension superficielle des milieux nutritifs. Action du taurocholate de sodium;
- 9° Potentiel d'oxydo-réduction (rH);
- 10° Conductibilité des suspensions bactériennes.

Dans les pages qui vont suivre, j'exposerai les résultats que j'ai obtenus en faisant précéder la partie expérimentale d'un résumé historique succinct.

Etant donnée la complexité du fait biologique, on est tenté de multiplier considérablement les expériences afin d'augmenter la précision de détermination d'une grandeur donnée. En réalité, ainsi que le fait remarquer CAMPBELL, la précision des mesures n'augmente pas indéfiniment « *ni même d'une façon continue avec le nombre d'observations* ». (A. DUPAIX, 1933.)

En microbiologie plus qu'en toute autre discipline, il faut non seulement multiplier les expériences (4 ou 5), mais encore s'efforcer de réaliser la « *bonne expérience* ».

Avant de commencer l'exposé de mes résultats, je tiens à remercier tous ceux qui, au Laboratoire de Microbiologie ont facilité mes recherches.

Ma reconnaissance va tout d'abord à Monsieur le Professeur LASSEUR pour les directives éclairées qu'il m'a dispensées et l'inépuisable bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

Je prie Monsieur le Professeur LASSEUR de bien vouloir trouver ici l'expression de ma déférente gratitude et de ma vive admiration.

Mes remerciements vont également à Madame A. DUPAIX-LASSEUR qui m'a fait bénéficier de sa compétence en matière de recherches microbiologiques. Je me permets de lui présenter mes respectueux hommages.

Je n'ai jamais fait en vain appel à la complaisance de Monsieur J.-G. MARCHAL, Maître de Conférences, dont les conseils avertis m'ont toujours été d'une aide précieuse. En acceptant de faire partie du jury de ma thèse il m'a fourni un témoignage de sympathie auquel je suis très sensible.

Monsieur le Docteur VERNIER m'a prodigué ses encouragements et ses conseils au cours des années que j'ai passées au Laboratoire. Il a bien voulu, lui aussi, juger ce travail. Je le prie d'accepter ici l'assurance de ma très grande reconnaissance.

Je ne saurais oublier également l'aide efficace que j'ai trouvée auprès de mes camarades, Mesdemoiselles LAROCHE et BERNÉ, Messieurs MOULIN, GEORGES, DECKER, ROSSIGNOL et MELCION. J'estime remplir un agréable devoir en leur exprimant mon amicale gratitude.

Enfin Monsieur André SACCHETTI, Garçon de Laboratoire, a été toujours un auxiliaire obligeant et dévoué et je l'en remercie vivement.



AVANT-PROPOS

Dans le « *Giornale della R. Societa Italiana d'Igiene* » (XVI, 1894, n° 1), C. GORINI a décrit dans les termes suivants une Bactérie lactique :

Bacillus lactis niger GORINI (1894)

FORME

Longueur moyenne: 5 à 7 microns.

Epaisseur moyenne: 1 à 3 microns.

Réunis en filaments qui forment eux-mêmes de longues chaînes souples de 2 à 4 éléments.

MOBILITÉ

Légèrement mobile.

DÉVELOPPEMENT

a) Sur gélatine. — En plaques à 20-22°, le développement commence au bout de 36 heures. En profondeur, les colonies forment des espèces de flocons d'un blanc terne, arrondis, occupant le centre de petits cratères de gélatine en voie de liquéfaction. Avec un grossissement de 70 diamètres, les colonies profondes apparaissent rondes, à contours réguliers, avec un contenu finement ponctué, jaune d'or éclatant, plus clair dans la partie médiane, qui encercle le centre de la colonie et le sépare de la périphérie.

Les colonies superficielles, au contraire, sont irrégulières, de forme variable, à contours sinueux, d'où partent des filaments entortillés plus ou moins nombreux, à contenu filamenteux qui prend, soit l'aspect d'une pelote, soit l'aspect d'un écheveau embrouillé, et quelquefois même jaune brun au centre, jaune clair doré à la périphérie.

Le développement se fait lentement. La partie substantielle de la colonie n'augmente que très peu, tandis que la zone de liquéfaction de la gélatine s'agrandit rapidement. Au 3^e jour, la colonie apparaît comme un petit disque blanc entouré d'une large zone d'un gris trouble, où, à faible

grossissement, on peut observer un amas central de substance sombre entouré d'un large réseau très fragile et transparent formé d'une quantité de fils extrêmement fins, semblable à une dentelle effilochée. A 90 diamètres, (Zeiss) on observe que les fils sont constitués par des chaînes de bacilles immobiles.

Aucune odeur caractéristique.

A 20-22°, après 24 heures, on observe un petit cratère de liquéfaction gris trouble, auquel fait suite un filament blanc très fin, qui va jusqu'au fond de la masse et duquel commencent à se détacher quelques filaments secondaires. Après 48 heures, la partie fondue s'élargit en forme d'écuelle, et tout autour du fil primitif se forment de petites barbes très fines. Si l'on continue l'expérience, il se forme une pellicule lisse et tellement mince qu'elle peut passer quelquefois inaperçue à la surface de la zone de gélatine liquéfiée, et elle va toujours en s'épaississant, tandis qu'au-dessous, dans la partie encore solide de la gélatine, le développement s'arrête et les petites barbes restent sans s'allonger et sans ramifications. La liquéfaction complète de la gélatine est achevée après une semaine environ. A 12-15°, le développement est très lent. Au 3^e jour seulement apparaît un petit filet blanc dans toute l'épaisseur de la masse, et la liquéfaction commence à peine au 6^e jour.

b) Dans la gélose. — A 37°, il se forme déjà, après 18 heures, une pellicule blanc terne, humide, peu épaisse, à contours irréguliers. Après 24 heures, la pellicule est de couleur jaune sombre, et après 48 heures, elle devient noire, tandis que la gélose qui l'entoure se fonce, et à la surface de l'eau de condensation apparaît une mince pellicule lisse blanchâtre.

c) Sur pommes de terre. — A 37°, après 24 heures, se forme une pellicule blanche de même couleur que la pomme de terre, lisse, humide, grasse, qui, par la suite, jaunit et envahit la surface de la pomme de terre jusqu'à ce que, après un temps qui varie avec la nature, la réaction et la cuisson de la pomme de terre, elle se dessèche et devienne d'un noir intense. A ce moment, la pomme de terre elle-même commence à noircir, et après quelques jours, elle est noire dans toute sa masse.

d) Sur bouillon. — A 37°, après 12 heures, on note un léger trouble uniforme. Après 18 à 24 heures, apparaît un voile lisse à la surface, pendant que le liquide sous-jacent s'éclaircit: Le 2^e jour, on constate la présence, sur la pellicule et dans le bouillon, de petites granulations blanches. Le trouble n'est jamais intense, et les phénomènes se manifestent à la

surface. Même si on brise la pellicule, elle se reforme, laissant le liquide sous-jacent limpide. Après 15 jours, le bouillon se trouble et on remarque au fond un dépôt blanc floconneux.

e) Dans le lait. — A 37°, le lait est coagulé en 48 heures, comme par une présure, avec une réaction amphotère ou légèrement alcaline. Par la suite, la masse se désagrège en un liquide jaunâtre, trouble, qui, une fois filtré, donne la réaction au biuret, caractéristique des peptones. Cette désagrégation demande plusieurs jours, et presque toujours il reste, au fond de l'éprouvette, des grumeaux de caséine. Aucune odeur spéciale n'émane de ces cultures, et il n'y a aucune émission de gaz. A 20-22°, le lait subit les mêmes modifications, avec un retard de 2 à 3 jours.

CONDITIONS DE TEMPÉRATURE

Se développe, même à la température ordinaire, mais beaucoup mieux à 30-37°.

RAPIDITÉ DE DÉVELOPPEMENT

Très grande.

SPORULATION

Les spores se forment à peu près au centre du bacille. Elles sont grandes, oblongues, et ne déforment pas la plastide.

BESOINS EN OXYGÈNE

Le germe se conduit presque en aérobie strict. En effet, dans la gélatine, sur la gélose, et sur les succédanés de la gélose, il se développe presque exclusivement à la surface, et peu, ou pas du tout en profondeur.

GÉLATINE

Elle est rapidement liquéfiée.

PRODUCTION DE GAZ

N'a pas été constatée.

PRODUCTION DE PIGMENTS

Sur la gélose et sur pomme de terre, il se forme un pigment noir qui envahit même le milieu. Aucune coloration sur gélatine, sur bouillon, sur lait. La pigmentation est liée à la présence de l'air et l'obscurité la favorise.

COMPORTEMENT ENVERS LES SUBSTANCES COLORANTES

Le bacille se colore très bien avec les couleurs d'aniline, et spécialement avec le violet de gentiane et la fuchsine. Il reste coloré en violet après action de l'alcool. Les spores se colorent assez aisément avec la fuchsine anilinée d'EHRlich et avec la fuchsine de ZIEHL, grâce auxquelles on peut obtenir de belles colorations de contraste par passage successif de la préparation dans une des deux fuchsines précitées, puis dans l'alcool chlorhydrique (alcool: 100; HCl: 3) et finalement dans le bleu de méthylène en solution aqueuse.

Dans le fascicule X des Travaux du Laboratoire de Microbiologie, le Professeur LASSEUR, en collaboration avec A. DUPAIX-LASSEUR et P. DOMBRAY, a magistralement exposé les résultats de leurs recherches concernant la dissociation de *Bacillus lactis niger* GORINI. Aussi n'apporterai-je qu'une modeste contribution à l'étude de cette dissociation et ma seule ambition est, comme je l'ai indiqué au début de ce travail, de trouver quelques caractères permettant la distinction entre les types dissociés: Ra, Rb et S.

CHAPITRE PREMIER

Dimensions de la plastide

Les caractères étudiés peuvent se ramener à deux groupes :

Les uns sont d'ordre morphologique ;

Les autres sont d'ordre physiologique.

Il paraît logique d'envisager d'abord les dimensions des trois types de Bactéries.

Nous pouvons poser en principe que dans les conditions d'expérience envisagées, les différents facteurs d'action ne m'ont pas permis d'obtenir des formes filtrables. Sous ces réserves, voyons comment ont pu varier les dimensions des types Ra, Rb, et S (1).

Le Doyen des Membres Honoraires de l'Association des Diplômés de Microbiologie de Nancy, M. le Professeur émérite ALMQUIST, auquel j'adresse ici l'expression de ma profonde et respectueuse admiration, a décrit, en étudiant les fructifications des microorganismes, un cycle assez compliqué.

Pour Arthur MEYER (1912), la plastide sporulée ou sporange, offre en général des dimensions et des aspects différents de ceux des plastides issues de la division par cloisonnement.

LASSEUR et ses Collaborateurs ont, eux aussi, constaté les variations

(1) Les êtres vivants sont sensibles aux agents physiques tels que la température et la pression, et aux agents chimiques. Ces derniers agissent par leur constitution, leur concentration, leur degré de dispersion micellaire, moléculaire, ou ionique. Les Bactéries qui, par toute leur surface, sont baignées par le liquide nutritif, sont infiniment plus sensibles et présentent un polymorphisme beaucoup plus grand que les êtres vivants d'organisation plus compliquée.

Il ne faudrait pourtant pas ramener les Bactéries à de petits cylindres, ou à de petites sphères, on y distingue une couche limitrophe : la membrane, des grains, des organes moteurs, des vacuoles, des substances de réserve, telles que graisses et protéines. Enfin, chez de nombreuses Bactéries, on observe un cycle assez compliqué, ce qui est le cas chez les Bactéries sporogènes.

de la forme d'une même souche bactérienne avec l'âge de la culture. Non seulement les Bactéries sporogènes, mais encore les non sporogènes, telles que les germes fluorescents, peuvent offrir un cycle assez compliqué (1911).

Lorsqu'on jette un coup d'œil, même rapide, sur deux préparations, l'une de *Colibacille* ou de *Bacille typhique* provenant de bouillon peptoné, l'autre des mêmes germes provenant de bouillon peptoné phéniqué, on constate des différences morphologiques importantes. Mais, il n'est pas besoin de recourir à l'agent chimique pour percevoir ces variations dans les dimensions, et c'est là que nous ferons intervenir les artifices de préparation ou « *artifact* ».

Examinons par exemple sur le frais une hémoculture. Nous percevons de longs bâtonnets très mobiles ou assez mobiles qui se déplacent entre les hématies avec des vitesses différentes.

Fixons par la chaleur cette même préparation, colorons-la par la méthode de Gram, nous voyons que les plastides ont considérablement diminué de longueur et de largeur. Ce fait nouveau est dû uniquement à la fixation par la chaleur. C'est donc une cause d'erreur qu'il faudra éviter dans l'étude de la variation des types dissociés (1).

Nous allons maintenant étudier les différences de dimensions des types Ra, Rb et S de *Bacillus lactis niger* GORINI.

Les quelques causes d'erreur que nous venons d'envisager nous conduisent à ne comparer entre elles que les plastides venant du même milieu nutritif, cultivées dans les mêmes conditions, fixées ou colorées par la même méthode, ou préférablement non colorées.

Comparons d'abord ces plastides colorées par la méthode de Gram. Nous notons en première approximation que les plastides du type Ra sont plus grandes que celles de Rb et S. Etudions maintenant le problème avec plus de précision. Essayons de représenter la population bactérienne de chaque type dissocié. Pour représenter la population bactérienne, nous utiliserons le mode graphique, qui nous avait été proposé par le Profes-

(1) On sait depuis les beaux travaux de GOTTHEIL (1901) que les dimensions de *Bacillus graveolens* varient suivant que les plastides sont desséchés et montés dans le baume, ou desséchés et montés dans l'eau.

Exemple. - Arthur MEYER cite: *B. graveolens*: Matériel vivant monté dans H²O, 1,5 micron de large. Matériel desséché et coloré à la fuchsine monté dans H²O, 1,39 micron de large. Le même monté dans le baume, 1,11 micron de large.

GRIMME (1902) estime que la largeur des Bactéries desséchées montées dans H²O et montées dans le baume varie dans le rapport de 3 à 2.

NEPVEUX (1920) signale des faits analogues avec *B. Bruntzi*.

seur G. DARMOIS dans une conférence faite au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, conférence qui montre tout l'intérêt des courbes intégrales de fréquence et, étant donnée l'autorité mondiale du savant parisien, j'ai adopté ce mode de représentation (1).

Avant de procéder à l'examen des courbes de fréquence obtenues, je vais exposer ici la technique que j'ai suivie pour obtenir les dimensions qui figurent dans ces courbes.

La technique employée est celle qu'a utilisée Marc BENOIT dans un travail fait au Laboratoire de Microbiologie en 1935 pour l'étude de la vitesse de décoloration dans la méthode de Grain.

Je me permets de la rappeler sommairement :

MILIEU UTILISÉ

Le milieu utilisé pour l'obtention de cultures des trois types de *Bacillus lactis niger* GORINI est la gélose peptone en tubes inclinés (2).

LAMES

Les lames porte-objets employées pour cette expérience sont des lames neuves préalablement lavées au mélange sulfo-chromique, puis à l'eau ordinaire, enfin, à l'eau distillée.

Ces différentes opérations ont pour but de débarrasser les lames des matières grasses qui pourraient nuire à l'étalement uniforme du matériel bactérien.

SUSPENSIONS

Les suspensions de plastides bactériennes sont effectuées à l'aide du fil de platine dans l'eau physiologique. D'opacité égale, elles comprennent environ 4 milliards de germes au centimètre cube.

ETALEMENT

Les gouttes de suspension bactérienne sont déposées sur les lames à l'aide de pipettes stériles effilées, puis étalées à l'aide d'une lamelle.

(1) Je ne saurais résumer en quelques lignes l'admirable conférence que fit le Professeur G. DARMOIS, et j'y renvoie le lecteur.

(2) pH = 7,2. Composition: peptone, 2 %; gélose, 3 %.

Abandonnés sous des couvercles de boîtes de Pétri jusqu'à ce que les préparations ne présentent plus de trace de liquide, ces préparations sont ensuite fixées deux minutes à la platine chauffante, à la température de fusion de la résorcine (112° C.).

COLORATION

La méthode de coloration employée est la méthode de Gram.

1° *Violet de gentiane*. — Le violet de gentiane utilisé est un violet phéniqué stabilisé (1) vieux de 7 ans.

2° *Solution de Lugol*. — Sa composition est la suivante :

Iode : 1 gr. ;

KI : 2 gr. ;

Eau distillée : 300 cm³.

3° *Décolorant*. — Alcool à 95°.

4° *Colorant de contraste*. — Fuchsine basique de Grüber à 0,032 gr. pour mille.

TECHNIQUE DE MESURE EMPLOYÉE

L'image des germes colorés en violet par la méthode de Gram est projetée à la chambre claire de Zeiss sur une feuille de papier blanc disposée à hauteur convenable. Il nous est alors facile de marquer chaque extrémité des plastides projetées, d'un trait de crayon très fin. La distance (2) entre deux traits est alors mesurée à l'aide d'une bande de papier résistant sur laquelle dix traits de longueur décroissante, placés à intervalles égaux, indiquent les longueurs de 10 à 1 micron. Chaque trait mesurant 10, 9, 8, 7, ... 1 micron, a été lui-même exactement mesuré à l'aide d'un micro-mètre objectif projeté à la chambre claire avec le même jeu de lentilles que celui employé pour les plastides.

100 plastides ont été mesurées pour chaque dimension et chaque type.

(1) Par le procédé de LASSEUR et de ses Collaborateurs, (1931).

(2) On aurait pu également utiliser le dispositif employé par LASSEUR et ses Collaborateurs c'est-à-dire la machine à diviser, l'appareil à projection, etc.

TABLEAU I

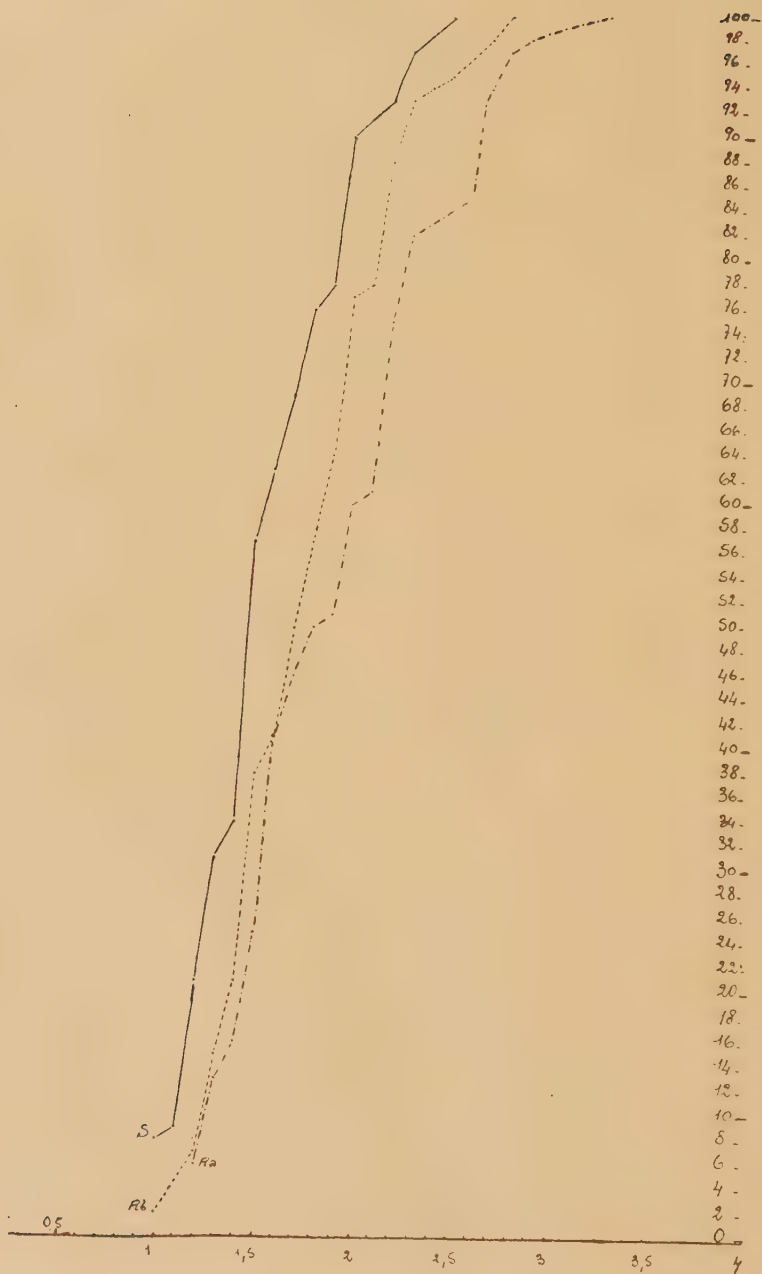
RÉSULTATS OBTENUS

Longueurs mesurées	Nombre de plastides mesurant cette longueur <i>B. lactis niger</i> GORINI		
	type Ra	type Rb	type S
—	—	—	—
1	—	2	8
1,1	—	—	1
1,2	6	5	12
1,3	7	8	10
1,4	3	6	3
1,5	9	17	23
1,6	16	3	6
1,7	5	9	6
1,8	4	7	7
1,9	1	7	2
2	9	13	12
2,1	1	1	—
2,2	14	10	3
2,3	7	5	4
2,4	—	1	—
2,5	—	1	3
2,6	3	—	—
2,7	9	3	—
2,8	3	2	—
2,9	1	—	—
3	—	—	—
3,1	—	—	—
3,2	—	—	—
3,3	2	—	—

En examinant la courbe intégrale des fréquences de ces longueurs (1), nous constatons que les longueurs peuvent se placer dans l'ordre décroissant suivant : S, Rb, Ra. Tout Bactériologiste serait tenté d'essayer une classification, et cela d'autant plus qu'avec d'autres germes, tels que *Bacillus chlororaphis* et *Bacillus aurantiacus tingitanus*, LASSEUR et ses Col-

(1) Le germe que j'étudie peut être ramené en première approximation à un cylindre. Mais en réalité, le plus souvent, nous n'avons pas l'image stéréoscopique en microbiologie et c'est plutôt la projection du cylindre, c'est-à-dire un rectangle, que nous mesurons.

Fig. 1



Courbe intégrale des fréquences des longueurs de
Bacillus licheniformis (types Ra Rb et S) obtenu sur
 gélose peptone à 2% après 12 heures d'étuve à 37°C
 (pH = 7,2)

laborateurs, A. DUPAIX-LASSEUR et C. MARION, ont pu constituer deux groupes, le premier constitué par Rb et S, le second par Ra. Et, chose curieuse, le type Rb se rapprochait plus de S que de Ra.

Si nous considérons les courbes de fréquence ci-dessus à la dimension moyenne 50 (qui correspond à 50 plastides dans chaque sens), nous voyons le type S se détacher nettement de Ra et de Rb. Nous retrouverons donc là sous une autre forme un fait signalé par Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs.

Envisageons maintenant les courbes de fréquence obtenues avec les largeurs mesurées.

TABLEAU II

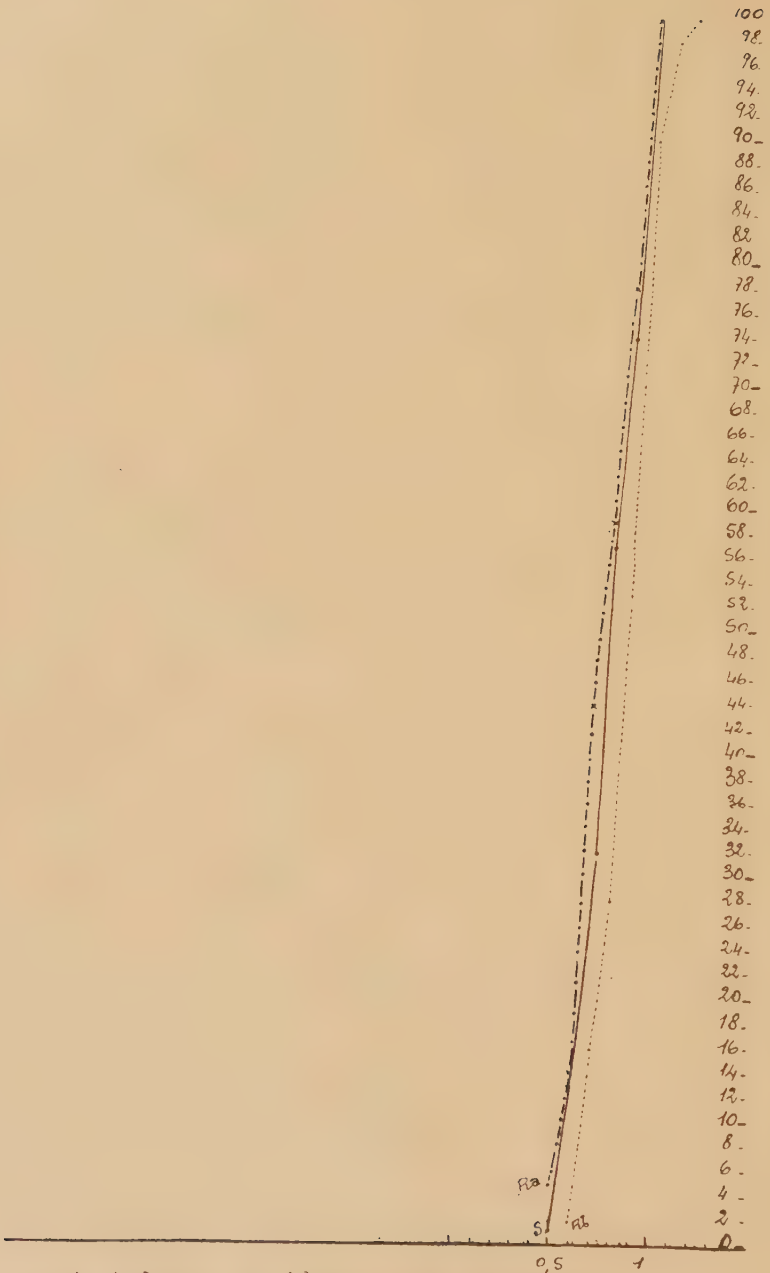
RÉSULTATS OBTENUS

Largeurs mesurées	Nombre de plastides mesurant cette largeur		
	type Ra	<i>B. lactis niger</i> GORINI type Rb	type S
0,5	5	—	1
0,6	9	2	12
0,7	30	14	19
0,8	15	12	25
0,9	19	29	17
1	22	33	26
1,1	—	8	—
1,2	—	2	—

A priori, les largeurs doivent présenter des variations beaucoup plus faibles, car nous avons affaire à une grandeur évidemment inférieure à la longueur, et, d'autre part, les causes d'erreur dans la mesure sont bien plus considérables que celles auxquelles on se heurte dans la détermination des longueurs. Sous ces réserves, nous constatons que le type Rb à la dimension moyenne 50 se différencie nettement des types Ra et S qui, eux, semblent identiques.

Il est un fait d'observation banale que les microorganismes s'allongent jusqu'à une certaine taille, puis se divisent par cloisonnement. Cette « *taille critique* » a été particulièrement bien mise en évidence par BRACHET (1917). Pour le célèbre savant belge, la taille normale est un état d'équilibre qui ne peut être dépassé sans entraîner inévitablement la

Fig. 2



Courbe intégrale des fréquences des largeurs de
Bacillus laetis niger Corini (types Ra, Ab et S) obtenu sur
 gélose peptone à 2% (pH=7.2) après 12 heures d'incubation à 37°C

division (A. DUPAIX, 1933). La taille normale n'est valable que pour un système considéré, dans un milieu de culture défini, à une température définie, et dans un temps défini.

Le rapport $\frac{L}{l}$ = k correspondant à un « état d'équilibre » n'est valable que pour des conditions déterminées et si on fait varier les facteurs d'action dans des conditions compatibles avec la vie des Bactéries.

PALGEN (1925) a observé des variations très importantes. Il signale une expérience très démonstrative, celle de l'influence de SO^4Mg , 7 H^2O sur la morphologie de *Bacillus mesentericus* et de *Bacillus subtilis*, lorsque le milieu renferme des quantités variables de SO^4Mg , ainsi qu'il ressort du tableau ci-dessous, où figurent quelques valeurs obtenues par PALGEN.

Concentration en SO^4Mg %	Rapport $\frac{L}{l}$ de	
	<i>B. mesentericus</i> (FRÆNCKEL)	<i>B. subtilis</i> (LASSEUR-THIRY)
—	—	—
0	7,1	6,23
5	3,53	3,66

De même, ROLIN, en 1929, a étudié avec beaucoup de précision les dimensions des germes sous l'influence du milieu et d'un certain nombre de colorants.

TABLEAU III

RÉSULTATS OBTENUS

avec *B. lactis Niger* GORINI, types Ra, Rb et S
cultivé sur gélose inclinée de pH = 7,2 à l'étuve à 37°
pendant 16 heures :

1° Pour les longueurs et largeurs moyennes :

a) *L* (longueur) :

	Ra	Rb	S
	—	—	—
Maximum	3,3	2,8	2,5
Moyenne	2	1,8	1,5
Minimum	1,2	1	1

b) *l* (largeur) :

	Ra	Rb	S
	—	—	—
Maximum	1	1,2	1
Moyenne	0,8	0,9	0,8
Minimum	0,5	0,5	0,5

2° Rapport $\frac{L}{l}$:

$$\begin{aligned} \text{Type Ra : } \frac{L}{l} &= \frac{2}{0,8} = 2,5. \\ \text{Type Rb : } \frac{L}{l} &= \frac{1,8}{0,9} = 2. \\ \text{Type S : } \frac{L}{l} &= \frac{1,5}{0,8} = 1,9. \end{aligned}$$

Comme on peut le constater, les trois types dissociés se placent dans l'ordre décroissant Ra, Rb et S, ces deux derniers étant très près l'un de l'autre, ce qui est ici rigoureusement conforme au fait signalé par LASSEUR et ses Collaborateurs.

— ∴ —

CHAPITRE II

Etude de la vitesse de décoloration

En 1884, GRAM rend un service immense à la Bactériologie en montrant que les Bactéries fixées puis successivement traitées par le violet de gentiane, la solution de Lugol, et l'alcool, peuvent se diviser en deux catégories, les unes restant colorées en violet ou violet noir, les autres au contraire se décolorant complètement. Lorsqu'on utilise une coloration de contraste telle que l'éosine ou la solution aqueuse de fuchsine, on constate que certaines plastides restent violettes et les autres roses, et pendant très longtemps, on admit en Bactériologie que les microorganismes « *prenaient ou ne prenaient pas le Gram* » suivant qu'ils restaient colorés en violet noir ou se teintaient en rose.

Au bout d'un certain temps, on se rendit compte que ces subdivisions étaient tout à fait arbitraires et bientôt NEIDE (1904), A. MEYER (1912), PALGEN (1925), LASSEUR et SCHMITT (1927), COUDRAY (1929), BACH et DELÉTANG (1931), LASSEUR, A. DUPAIX et MAGUITOT (1931), A. DUPAIX (1933), virent la nécessité de substituer à la notion de « *prend ou ne prend pas le Gram* » celle de « *durée* » ou de « *vitesse de décoloration* ».

On sait que le pouvoir tinctorial de certaines solutions colorantes est considérablement augmenté par la présence de phénol (acide phénique). Mais on sait aussi que l'addition de phénol diminue considérablement la stabilité des solutions. Les solutions de violet notamment présentent instantanément une louche ou un trouble qui fait place à la formation de petits flocons se déposant au fond du récipient et sur ses parois. Or, si l'on traite deux préparations provenant d'une même culture microbienne, l'une avec la solution fraîchement préparée, l'autre avec la solution âgée de plusieurs mois, on constate que bien souvent la Bactérie qui aurait dû « *prendre le Gram* » se décolore sous l'action de l'alcool.

Aussi, il n'est pas rare de trouver dans la littérature afférente aux espèces microbiennes, des contradictions en ce qui concerne la méthode de Gram. Les facteurs de stabilité des solutions colorantes sont nombreux. De très bonne heure, les Bactériologistes cherchèrent à augmenter le pouvoir tinctorial des solutions de violet de gentiane par l'addition d'aniline, puis on s'aperçut que cette dernière pouvait être remplacée avantageusement par le phénol, dont nous avons signalé plus haut l'action sur ce colorant.

Les Microbiologistes s'efforcèrent de stabiliser les solutions de violet de gentiane, et pour cela ils firent appel à des faits qui avaient été observés dans l'étude des solutions colloïdales. Les métaux, à l'état micellaire, ne résistaient pas longtemps à l'action précipitante du temps, et ZSYGMONDI (1) avait stabilisé des suspensions d'or et d'argent en déposant à la surface de la phase dispersée un film de gélatine.

Les Bactériologistes réussirent, à l'aide d'apports de gélatine en proportion convenable, à retarder la précipitation du colorant. Mais les solutions ainsi stabilisées ne conservaient leur pouvoir tinctorial que quelques semaines ou quelques mois.

Nous avons vu que le phénol, s'il augmente le pouvoir tinctorial des solutions colorantes, diminue malheureusement dans des proportions considérables la stabilité des solutions de violet. Les choses en étaient là lorsque BOUTARIC décrivit un fait vraiment curieux et bien inattendu.

Nul n'ignore combien le célèbre physicien dijonnais a travaillé avec le Professeur ACHARD, et de ce fait, s'est longuement familiarisé avec les phénomènes biologiques. BOUTARIC avait donc remarqué que les suspensions colloïdales avaient une durée éphémère et, après d'autres auteurs, il déplora l'action précipitante d'un ion déterminé pour une solution donnée. Il tenta alors de réaliser dans les solutions colloïdales des phénomènes rappelant la vaccination. Il démontra, en effet, expérimentalement « *la protection qu'exerce l'addition d'un électrolyte en quantité très faible contre la floculation produite par des doses plus fortes du même électrolyte* » (1931).

LASSEUR et ses Collaborateurs, mettant à profit la découverte de BOUTARIC, sont arrivés à préparer des solutions stables de colorants en combinant l'action du phénol et celle de la gélatine. J'indique ci-dessous le

(1) ZSYGMONDI appelle « *indice d'or, le nombre de milligrammes de colloïde protecteur exactement nécessaire pour empêcher le virage au violet de 10 cm³ de solution d'or rouge vif* » (COUDRAY, 1929, thèse de Pharmacie, Faculté de Nancy, p. 77).

tableau d'apport du phénol à la solution de violet qui figure dans la thèse de A. DUPAIX, à la page 61.

La solution colorante définitive est constituée par :

Solution alcoolique de colorant à 10 %.....	50 cm ³
Solution de gélatine à 0,2 %.....	200 cm ³
Solution d'acide phénique à 5 %.....	250 cm ³

On ajoute lentement à la solution de colorant à 10 %, les 200 cm³ de solution de gélatine. Le mélange est mis à l'étuve à 37° C. durant 24 heures. Les doses croissantes d'acide phénique sont additionnées à la solution hydroalcoolique gelatinisée, dans l'ordre suivant :

1 ^{er} jour :	0,05 cm ³ de la solution phéniquée à 5 %.	
2 ^e jour :	0,10 cm ³	—
3 ^e jour :	0,50 cm ³	—
4 ^e jour :	1 cm ³	—
5 ^e jour :	5 cm ³	—
6 ^e jour :	10 cm ³	—
7 ^e jour :	25 cm ³	—
8 ^e jour :	50 cm ³	—
9 ^e jour :	50 cm ³	—
10 ^e jour :	108,35 cm ³	—
Total :	250 cm ³	

On laisse 4 jours au repos, puis on filtre.

Muni d'une solution qui me permettait d'opérer toujours dans les mêmes conditions d'expérience, j'ai alors déterminé la vitesse de décoloration dans la méthode de Gram des trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après et 3 graphiques permettent au Lecteur de se représenter les différences de vitesses de décoloration entre ces trois types.

La technique employée pour l'obtention de cultures pures, pour la mise en suspension des plastides bactériennes, pour l'étalement de ces suspensions sur les lames porte-objets est la même que celle employée pour la mesure des dimensions des germes dans le chapitre précédent.

Les temps d'action des différentes solutions sont les suivantes :

Violet de gentiane : 2 minutes ;

Lugol (première série de vases de Borrel) : 30 secondes ;

Lugol (deuxième série) : 1 minute 30 ;

Alcool : 5, 10, 20, 40 et 60 minutes ;

Eau distillée : 1 minute ;

Fuchsine de Gram : 45 secondes ;

Eau distillée pour lavage des préparations : 2 minutes.

PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

Les solutions colorantes ou décolorantes ont été réparties dans des vases Borrel. Pour l'agitation et l'immersion simultanée des préparations, j'ai employé le dispositif utilisé au Laboratoire de Microbiologie par BENOIT : planchettes avec pinces clouées par deux, chacune de ces pinces retenant deux lames accolées par leur surface libre. Ce dispositif a l'avantage de donner des résultats comparables. Les temps de contact des lames avec les solutions colorantes ou décolorantes ont été chronométrés et les lames égouttées après chaque opération sur du papier Joseph.

Pour effectuer la numération des germes colorés en violet et des germes colorés en rose, j'ai employé, comme dans l'expérience précédente, la chambre claire de Zeiss.

RÉSULTATS OBTENUS

Une expérience préalable m'avait montré qu'une suspension de *Staphylococcus aureus* obtenue sur gélose inclinée après 16 heures d'étuve ne présentait, après une heure d'action d'alcool à 95° que des plastides colorés en violet dans la proportion de 95 %. Le pourcentage de germes décolorés par l'action à 95° a été compté pour chacun des types de *Bacillus lactis niger* GORINI, sur cinq lames, afin de réduire au minimum les erreurs d'expérience.

Tableaux montrant le pourcentage de germes décolorés aux différents temps d'action de l'alcool à 95° :

TABLEAUX

TABLEAU IV

B. lactis niger GORINI type Ra

Temps d'action de l'alcool à 95°	5'		10'		20'		40'		60'	
	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—
1 ^{re} lame.....	100	0	42	64	38	58	18	82	4	96
2 ^e lame.....	100	0	41	69	44	64	21	79	4	98
3 ^e lame.....	98	2	36	45	36	62	23	77	12	88
4 ^e lame.....	99	1	40	48	39	49	15	85	10	90
5 ^e lame.....	99	1	53	57	59	68	20	80	6	94
Pourcentage de germes décolorés	0,8		58		70		81		93	

B. lactis niger GORINI type Rb

Temps d'action de l'alcool à 95°	5'		10'		20'		40'		60'	
	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—
1 ^{re} lame.....	100	0	98	2	95	5	92	8	91	9
2 ^e lame.....	98	2	99	1	102	4	90	10	91	9
3 ^e lame.....	97	3	100	0	99	1	94	6	89	11
4 ^e lame.....	99	1	100	0	97	2	91	9	90	10
5 ^e lame.....	100	0	99	1	100	4	92	8	89	11
Pourcentage de germes décolorés	1,2		0,8		3		8		10	

B. lactis niger GORINI type S

Temps d'action de l'alcool à 95°	5'		10'		20'		40'		60'	
	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—	Gr.+	Gr.—
1 ^{re} lame.....	100	1	97	3	85	5	88	12	85	15
2 ^e lame.....	98	2	110	11	78	4	86	14	86	14
3 ^e lame.....	99	1	92	5	100	10	89	11	83	17
4 ^e lame.....	99	1	120	9	90	6	90	10	89	11
5 ^e lame.....	97	3	100	5	72	4	88	12	87	13
Pourcentage de germes décolorés	1,6		6		6		12		14	

N B. — Je n'ai employé les termes de Gram positif et Gram négatif que pour la commodité de la rédaction.

Fig. 3



Le graphique montre : 1° que le pourcentage des germes décolorés par l'alcool va croissant avec le temps d'action de l'alcool pour les trois types de *Bacillus lactis niger* GORINI ; 2° que le pourcentage atteint après une heure d'action du décolorant 93 % des plastides pour la souche Ra, alors qu'il n'atteint que 10 % pour Rb et 14 % pour S.

Nous retrouvons là les deux groupes Ra et Rb-S. Il est à remarquer que les différences de comportement entre Ra et Rb-S sont considérables. Ces faits sont superposables à ceux observés dans l'étude des dimensions.

CHAPITRE III

Sporulation et germination

La germination des spores est un caractère assez précis, et si une espèce est considérée comme étant de germination équatoriale, ce ne sera qu'exceptionnellement qu'on pourra voir le bâtonnet sortir entre l'équateur et le pôle de la spore. De même, la germination polaire entraîne toujours la sortie de la spore à un ou aux deux pôles. Le phénomène physiologique a fait l'objet de nombreuses recherches.

En 1904, NEIDE dresse un tableau de la forme d'une série de spores (1).

(1) En 1905 Oscar BLAU a décrit des phénomènes de germination équatoriale.

Noms	Synonymie	Forme
<i>B. megatherium</i> HEINZE (B) <i>B. megatherium</i> DE BARY	<i>Bact. sessilis</i> (KLEIN) <i>Bact. brassicae</i> (POUNNER) <i>Bact. flexile</i> (BURCHARD)	N = ovale + rarement cylindrique Forme de haricot et ronde
<i>B. robur</i> (A. MEYER et NEIDE)	<i>B. cursor</i> (BURCHARD) <i>B. cereus</i> (FRANKLAND)	N = ovoïde, cylindrique rarement presque ronde.
<i>B. silvaticus</i> (A. MEYER et NEIDE)	<i>B. Hessii</i> (GUILLEBEAU, KRUSE)	N = ovale ou bâtonnet cylindrique haricot
<i>B. teres</i> (A. MEYER et NEIDE) <i>B. globigii</i> <i>B. mesent. ruber</i> (GLOBIG)	<i>B. albolactis</i> et <i>B. lactis albus</i> (HÖFFLER)	N = cylindrique, rarement ovoïde ou haricot
<i>B. lacticola</i> (A. MEYER et NEIDE) <i>B. lactis</i> FLÜGGE V	<i>B. goniosporus</i> (BURCHARD) <i>B. lacteus</i> LEMBKE <i>B. butyricus</i> HUEPPE	N = cylindrique ou elliptique
<i>B. lactis</i> FLÜGGE I	<i>B. cylindrosporus</i> (BURCHARD) <i>B. amarificans</i> BLEISCH <i>B. agglomeratus</i> PANSINI	N = cylindrique ovale, plus rarement en forme de tambour
<i>B. parvus</i> (A. MEYER et NEIDE) <i>B. tenuis</i> ou <i>Tyrothrix</i> <i>B. laevis</i> G. et P. FRANKLAND <i>tenuis</i> DUCLAUX	<i>B. leptodermis</i> BURCHARD <i>B. leptosporus</i> L. KLEIN <i>B. lactis</i> FLÜGGE <i>B. n° 6</i> PANSINI <i>B. coccoides</i> PANSINI <i>B. geniculatus</i> DE BARY	N = cylindrique pôle plat. Rarement ovale.
<i>B. sphæricus</i> (A. MEYER et NEIDE) <i>B. gracilis</i> (ZIMMERMANN) <i>B. sepdoteticus</i> KRUSE	<i>Plectridium palludosum</i> FISCHER <i>B. butyricus</i> (BOTTEIN) <i>B. putrificus coli</i> FLÜGGE <i>B. thalassophilus</i> RUSSEL	N: ronde.
<i>B. alvei</i> KROMPECHER	<i>B. alvei</i> (CHESHIRE)	Ronde, quelquefois aplatie.

ssé par NEIDE en 1904.

Taille	Germination	Observations
1,4 à 2,8 μ $\times$ 0,7 à 1,1 μ	Polaire, quelquefois un peu latérale par rapport au pôle	Exine et intine
0,8 à 1,3 $\times$ 1,4 à 2,1	Polaire	Exine et intine
$\underbrace{1,7 \times 1,1}_{\text{ovale}}$ $\underbrace{1,75 \times 0,8}_{\text{cylindrique}}$	Equatoriale rarement polaire.	Exine et intine
1,5 $\times$ 0,9	Polaire, équatoriale, arrachement unilatéral de la membrane	La membrane offre des gibbosités ou protubérances. Exine et intine visibles à la fuschsine
2 $\times$ 0,75	Le plus souvent polaires, quelquefois bipolaires, rarement équatoriales	Exine et intine visibles au Gram. (Visibles que dans certains cas.)
2 $\times$ 0,95 à 1 ovale 1,3 $\times$ 0,9	Polaire	Exine et intine visibles à la fuschsine Membrane ligne forte.
1,1 à 1,2 $\times$ 0,35 à 0,4	Polaire, équatoriale (25 %).	Membrane visible (Exine et intine non visibles)
1,2 moyennes 0,9 petites 1,5 grandes	Equatoriale, arrachement unilatéral ou circulaire.	Membrane épaisse (Exine et intine visibles) Sporange en forme de baguettes de tambour Sporanges mobiles.
1,0 $\times$ 1,1	Polaire.	Spore mûre souvent entourée d'une membrane sporange Membrane visible Exine et intine chez les vieilles spores Sporanges en forme de baguettes de tambour

Les spores ont été considérées dès le début de la Bactériologie comme des organes de résistance, et on admettait que la sporulation était d'autant plus abondante que le milieu était plus défavorable à la végétation, soit qu'il s'agisse d'un milieu composé, soit qu'il s'agisse d'un milieu épuisé [STRAUS (1887), HOLZMÜLLER (1909)], soit que l'accumulation des produits de déchets l'ait rendu impropre au développement des Bactéries.

On s'aperçut par la suite que cette façon de voir était erronée et que les Bactéries, pour donner une sporulation abondante, avaient besoin d'être cultivées d'abord dans un milieu assez riche, sinon très favorable à la végétation (1). Les spores n'apparaissaient plus alors comme des aboutissants de conditions défavorables, c'est-à-dire comme des formes de résistance, mais bien comme un stade d'un cycle évolutif. Aussi, devait-on penser au rôle que devaient jouer certaines hormones et dans le développement des Bactéries, et dans leur sporulation.

Le lecteur trouvera dans GOTSCHLICH (1927) une vue d'ensemble de nos connaissances sur la spore.

A. MEYER, qui a consacré un volume des plus intéressants à l'étude de la cellule bactérienne, admet l'existence d'un bâtonnet germinatif et de sporanges. On sait que les spores possèdent un éclat particulier, en général une couleur verdâtre, et qu'elles sont très réfringentes. Mais, lorsque par déhiscence, elles sont mises en liberté, leur coloration par les méthodes usuelles est impossible, et il faut avoir recours à des mordants tels que l'acide chromique. Le matériel, mordancé ou non, est soumis soit à la méthode de Ziehl, soit à celle d'Alessandrini.

Dans la période précédant le stade de l'acido-résistance, la spore possède presque les mêmes dimensions, mais elle se colore par les solutions usuelles. BREFELD (1881) et A. MEYER (1887), ainsi que de nombreux auteurs, désignent ce stade sous le nom « *d'ébauche de spores* ».

La spore considérée du point de vue de sa formation:

Pour certains auteurs qui se trouvent cités dans la thèse de mon camarade P. THOMAS (1930), la spore proviendrait d'un seul grain et deux théories s'affrontent à ce sujet.

(1) Pour GOTSCHLICH, LEHMANN et OSBORN, la sporulation est d'autant plus abondante, plus active, que le milieu est plus favorable initialement.

PREMIÈRE THÉORIE

La spore est issue d'un granule qui prendrait naissance au dépens de grains plus petits se fusionnant. Evidemment, la constitution de cette formation est différente de celle du reste de la plastide bactérienne. DE BARY, ZOPF, VIGNAL, BUNGE, BURCHARD, MIGULA, WAHRlich, SCHAUDINN, RUZICKA et AMATO soutiennent cette hypothèse.

DEUXIÈME THÉORIE

Pour d'autres savants, et non des moindres, l'ébauche de la spore apparaîtrait comme une formation différenciée sans contours nets et qui, dès le début, a la grandeur de la spore. Par contre, l'ébauche de spore n'en possède immédiatement ni les caractères physiologiques, ni les caractères tinctoriaux. Que l'ébauche soit ronde, ovale, elliptique, elle se colorera comme le reste du cytoplasme de la plastide, et n'aura pas encore acquis l'acido-résistance. Ce n'est donc que plus tard qu'apparaîtront les modifications du cytoplasme : condensation, modifications de la perméabilité, etc... Cette théorie est défendue par PRAZMOWSKY, BREFELD, KOCH, PETERS, KLEIN, FRENZEL, FISCHER, MEYER, WAGNER, NAKANISHI, PREISZ, MÜHLSCHLEGEL, FÉDOROWITCH, GUILLIERMOND.

Dans ses belles recherches sur les Bactéries sporulées, NEIDE (1903) a été conduit à admettre l'existence de trois groupes de Bactéries. Dans le 1^{er} groupe : la spore apparaît avant 24 heures ; dans le 2^e groupe : la spore apparaît entre 24 heures et 3 jours ; dans le 3^e groupe : la sporulation exigerait des temps supérieurs à 3 jours (1).

Déjà en 1887, le mécanisme de la sporulation préoccupait les Bactériologistes, et avec sa sincérité scientifique, STRAÜSS (1887) reconnaissait que les causes de ce phénomène nous échappent. On sait depuis longtemps (E. ROUX, 1887) que les spores résistent mieux aux agents physiques et chimiques que les bâtonnets germinatifs.

ELLIS, 1902, cherchait jusqu'à quelle concentration NaOH ou PO^4H^3 favorisent la sporulation (2).

(1) Pour le *Bacille du Charbon*, d'après GOTSCHLICH :

A 16° : après 7 jours ;

A 21° : après 72 heures ;

A 25° : après 35 à 40 heures ;

A 30-32° : après 24 heures.

(2) Aujourd'hui on se place à un point de vue un peu différent. On parlerait plutôt de la concentration en ions H^+ (pH) et en ions OH^- .

L'influence des solvants des lipoides sur la sporulation des Bactéries aérobies a été étudiée longuement par MICHAÏLOWSKY. En 1913 BAUDER et L. ROSENTHAL signalent l'obtention de races asporogènes par la culture en présence d'agents physiques et chimiques.

AMBROZ (1909) rappelle les recherches de PREISZ le savant bactériologiste hongrois. Dans les figures de PREISZ, on observait d'abord un grain de chromatine auquel faisait suite un noyau: le noyau de la spore.

RUZICKA et AMBROZ ne pensent pas que le grain de chromatine puisse être l'ancêtre du noyau (1).

BALU (1906) signale l'action de la température sur la sporulation, et je relève quelques chiffres concernant certaines Bactéries sporulées.

	Germination	Croissance des oïdies	Sporulation
	—	—	—
1) <i>B. mycoïdes</i>	30-35° C.	30-35° C.	30-35° C.
2) <i>B. lactis</i>	40-45° C.	40-45° C.	40-45° C.
3) <i>B. megatherium</i>	45-50° C.	45-50° C.	35-40° C.
4) <i>B. subtilis</i>	55-60° C.	55-60° C.	55-57° C.

HOLZMULLER (1909) étudie du point de vue germination les races α , β , γ , et δ de *Bacillus mycoïdes* (2).

En 1910, P. GEORGEVITCH décrit chez *Bacillus thermophilus Jivoïni novo species*, la formation de la spore. Ce savant observait à un pôle la formation de petits granules colorables qui finissaient par se réunir, constituant ainsi la « préspore de GEORGEVITCH ».

Suis-je autorisé à rapprocher ces faits de ceux que j'ai observés chez *Bacillus lactis niger* GORINI souche Rb? Pour répondre à cette question, je rappellerai les images qu'il m'a été donné de percevoir avec *B. lactis niger* GORINI.

Il est difficile de se prononcer sur la valeur de cette formation, étant donné que j'ai constaté les figures suivantes chez *Bacillus lactis niger*

(1) Dans ce mémoire j'évite de soulever la question du noyau des Bactéries car cela mentrainerait beaucoup trop loin. On sait combien cette question a suscité de recherches tant en France qu'à l'étranger.

(2) Chez *B. mycoïdes* FLÜGGE la germination est polaire.

Chez *B. subtilis* COHN, elle est:

1° Latérale avec petits bâtonnets;

2° Latérale avec grands bâtonnets;

3° Equatoriale.

(GOTTHEIL, 1901.)

GORINI type Rb, figures obtenues par la méthode d'ALESSANDRINI.

Dans ces schémas, qui vont du jeune sporange à la spore libre, il y a donc, en plus des modifications morphologiques, des modifications de la colorabilité.

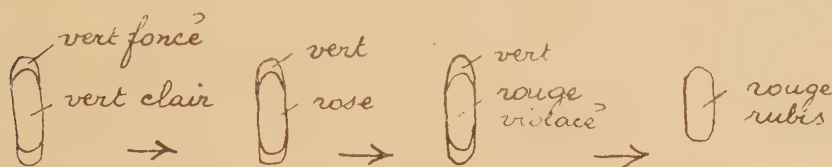


Fig. 4

NOMBRE DES SPORES DANS UNE PLASTIDE

Certains auteurs ont décrit plusieurs spores dans la même cellule bactérienne.

MÜHLSCHLEGEL n'a jamais vu deux spores dans la même cellule et, lorsque par hasard ce fait semblait se produire, il était possible de mettre en évidence une fine cloison qui les séparait.

Dans mes recherches *Bacillus lactis niger* GORINI, type Rb ne présente qu'une seule spore par plastide.

COLORABILITÉ

Dès 1894, KINSCHERF attribue la colorabilité spéciale de la spore à sa membrane, tandis que BUNGE (1925) incrimine la substance même de la spore. Même au début, bien qu'elle soit encore dépourvue de membrane, la spore est déjà acidorésistante et se comporte donc comme la spore adulte.

Chez les spores en voie de germination, on assiste à la disparition de la colorabilité spécifique. Ces faits peuvent être imputables soit à des phénomènes d'hydratation (gonflement), soit à l'organisation du bâtonnet germinatif à l'intérieur de la spore.

Contrairement à BUNGE, A. MEYER pense que la membrane joue un rôle primordial dans la coloration des spores.

Pour MÜHLSCHLEGEL, c'est le noyau qui est cause de la non-colorabilité des spores par les méthodes usuelles.

NAKANISHI, étudiant la sporulation du *Bacille du charbon* est conduit à distinguer :

1° Une forme ovale, fortement réfringente, munie d'une membrane épaisse. Cette forme n'est pas colorée par le bleu de méthylène; il l'appelle forme α ;

2° Une spore β , plus grande, plus ronde, que la forme α . Elle se colore facilement par le bleu de méthylène en montrant un ou deux noyaux;

3° Une forme γ sensiblement semblable à la précédente, mais elle est souvent un peu plus ronde. Enfin, elle présente fréquemment sur le côté un point saillant coloré en bleu. Dans cette troisième forme, il n'y aurait pas de noyau.

La littérature relative à la sporulation est extrêmement abondante (1). Nous ne pouvons donc pas résumer toutes les recherches ayant trait aux différences de formes chez les spores d'une même espèce bactérienne. Mais, nous pouvons retenir, comme un fait établi depuis 1901 déjà, qu'une Bactérie qui avait fait l'objet d'un nombre considérable de mémoires présentait trois types de spores absolument différentes, et ce sont des observations de ce genre qui m'ont conduit à rechercher si, parmi les trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI, il ne serait pas possible d'observer des différences importantes dans la sporulation.

LASSEUR a toujours eu un faible pour les Bactéries chromogènes, et depuis de longues années *Bacillus mesentericus niger* LUNT faisait l'objet de recherches systématiques au Laboratoire de Microbiologie.

M. le Professeur Gorini a bien voulu nous adresser une culture de *Bacillus lactis niger* GORINI (1894).

Par suite d'une erreur matérielle, Lasseur, A. Dupaix-Lasseur et J.-G. Marchal attribuent des spores au type Ra, spores qui, en réalité, ne se voient qu'avec le type Rb. A la demande de M. Lasseur, j'ai tenu à rectifier cette erreur. C'est ce qui m'a conduit à l'étude de la sporulation chez les trois types dissociés.

(1) Tout récemment Robert L. STARKEY, savant Microbiologiste américain, a étudié au Laboratoire du Professeur KLUYVER à Delft, la sporulation chez *Vibrio desulfuricans*. Ce travail, comme tous ceux issus du célèbre Laboratoire de KLUYVER, est riche en idées nouvelles et projette une lumière singulière sur la Biologie des microbes de réduction des sulfates.

Sporulation chez *Bacillus lactis niger* GORINI

RECHERCHES NOUVELLES

On sait maintenant que certains germes sporulent très facilement, et que d'autres souches de la même espèce n'offrent que difficilement des formes de résistance. L'étude de la sporulation chez *B. lactis niger* GORINI montre que les trois types dissociés, peuvent présenter des différences essentielles dans la formation des spores (1), et il y a donc là un caractère qui permet de les classer. Avant d'exposer ces différences, je vais décrire la technique employée pour l'obtention de cultures pures et de préparations colorées.

TECHNIQUE EMPLOYÉE

Milieu utilisé. — Le milieu utilisé a été la gélose peptone à 2 % de peptone et 3 % de gélose, de pH = 7,2.

Technique d'ensemencement. — Pour ensemercer le germe sur les géloses inclinées, j'ai constaté qu'il était préférable de déposer le matériel bactérien dans l'eau de condensation, puis, par un mouvement d'inclinaison du tube, de répartir cette suspension sur le milieu. L'ensemencement de la gélose au fil de platine, aurait l'inconvénient de faire retrouver sur les lames colorées, des spores, qui, enfermées dans des particules de matériel apporté, n'auraient pas été mises en contact avec le milieu nutritif. De ce fait, elles seraient restées intactes, ce qui constituerait une cause d'erreur. Les tubes sont ensuite fermés au coton, flambés, et mis à l'étuve à 37° C.

Mise en évidence des spores. — J'ai employé, pour mettre les spores en évidence, la méthode d'Alessandrini. Je vais la rappeler sommairement. Les préparations étalées au fil de platine (2) sont fixées à la platine chauffante, deux minutes à la température de fusion de la résorcine.

On fait subir aux préparations l'action de la fuchsine phéniquée de Ziehl au bain-marie à 80° C. environ, pendant 10 minutes. Les préparations sont alors traitées par la solution de sulfite de Na à 2 pour mille qui décolore les plastides en laissant colorées en rouge les spores.

(1) Comme d'ailleurs le *Bacille du charbon* et d'autres germes sporogènes.

(2) Stérilisé à la flamme.

Après lavage à l'eau distillée, les préparations sont appliquées sur des feuilles de papier buvard très fin (1) puis recouvertes de solution de vert malachite à 1 % pendant deux minutes. Après ce laps de temps, on rejette ce dernier colorant et on lave les préparations, puis on les sèche rapidement à 37° à l'abri de l'air. Les spores apparaissent en rouge rubis sur le fond vert des plastides.

RESULTATS OBTENUS

SPORULATION

Il est à remarquer que, dans les conditions d'expérience où je me suis placé, je n'ai constaté chez *Bacillus lactis niger* GORINI Ra et S aucun phénomène de sporulation. L'étude de ce phénomène se limitera donc à la souche Rb.

J'ai étudié, heure par heure, le comportement de la culture mise à l'étuve à 37 °C., et j'ai fait les observations suivantes.

Après onze heures et demie de séjour à 37° C., les lames colorées par la méthode d'Alessandrini ont présenté des plastides colorées en vert avec des extrémités ayant pris plus énergiquement le colorant, comme il a été dit précédemment, tandis que trente minutes plus tard, le centre de ces plastides était coloré en rose. Il s'agit donc là de sporanges. Les extrémités sont colorées en vert ou en rouge violacé. Chez certaines plastides, l'une des extrémités a déjà disparu, ce qui est le premier acheminement vers la spore libre. Après treize heures, on ne trouve guère, à côté d'un certain nombre de plastides intacts, que des spores libres colorées en rouge rubis.

J'ai effectué, à titre de comparaison, l'étude de la sporulation chez *Bacillus megatherium* (2) et chez *Bacillus mesentericus* (3). Mes observations ont porté sur les souches Ra et Rb de ces deux Bacilles. Avec ces quatre souches on observe des faits analogues à ceux observés avec la souche Rb de *Bacillus lactis niger* GORINI. Ainsi elles présentent en douze heures le même aspect de bâtonnets sporogènes, et en onze heures

(1) Pour éviter les phénomènes de dessiccation et enlever néanmoins l'excès de colorant rouge qui a pu persister.

(2) *Bacillus megatherium* DE BARY (souche CALMETTE).

(3) *Bacillus mesentericus niger* LUNT.

et demie, également des plastides où les pôles ont pris plus vigoureusement le colorant. Une différence notable néanmoins : dans la position de la spore à l'intérieur des plastides. La spore, dans les deux souches de *Bacillus megatherium* semble polaire, ou tout au moins largement déportée vers une extrémité, alors que chez *Bacillus lactis niger* GORINI, type Rb, comme d'ailleurs chez *Bacillus mesentericus* type Ra et Rb, elle est nettement centrale ou tout au plus légèrement déplacée vers une extrémité.

L'examen des souches Ra et S de *Bacillus lactis niger* GORINI, poursuivi jusqu'au 10^e jour, à 37° C., ne permet toujours pas de déceler la présence de spores. On ne constate plus guère que la présence de plastides semblant en voie de lyse. Par contre, chez le type Rb, on ne voit pratiquement plus que des spores.

Au cours de ces recherches, j'ai constaté qu'après de nombreux passages sur gélose inolinée, *B. lactis niger* GORINI type Rb donne toujours des plastides à coloration facile, tandis que Ra et S, dans les mêmes conditions, se développent assez lentement et donnent des préparations difficiles à colorer. Le microscope montre des plastides à contours peu nets. La présence d'un bactériophage qui ne saurait attaquer les spores de Rb me semble ici une explication plausible.

GERMINATION

D'après les observations précédentes, seul *B. lactis niger* GORINI type Rb présente des spores. C'est donc à ce type que je bornerai mes expériences sur la germination.

En partant d'une vieille souche de *B. lactis niger* GORINI type Rb (un mois), exclusivement composée de spores et réensemencée sur gélose inclinée, mise à l'étuve à 37° C., j'ai constaté que la germination de la spore avait lieu après deux heures et demie environ, et qu'elle était équatoriale dans tous les cas observés.

La spore en germination présente deux épaississements de part et d'autre d'un amincissement formant charnière en face de l'ouverture pratiquée dans la paroi de la spore par la sortie de la plastide. Les figures de germination observées avec *B. lactis niger* GORINI rappellent celles que Marc BENOIT (1935) a reproduites dans sa thèse, au chapitre consacré à *Bacillus mesentericus* et à *Bacillus subtilis*.

Comme pour la sporulation, j'ai étudié la germination chez *Bacillus*

megatherium, souche CALMETTE, types Ra et Rb et chez *Bacillus mesentericus niger* LUNT types Ra et Rb.

1° *Bacillus megatherium*, souche CALMETTE, types Ra et Rb. — Sur deux souches conservées 24 heures à l'étuve, puis exposées 5 jours à la température ordinaire, on ne voit plus que des spores et quelques rares Bacilles.

En partant de ces souches réensemencées sur gélose inclinée et cultivées selon le procédé déjà décrit, j'ai obtenu :

Pour le type Ra : au bout de deux heures, à côté des plastides minces, fines, longues, et faiblement colorées en vert, des plastides plus larges, plus trapues, intensément colorées en rouge violacé et présentant à leur base une spore ayant subi la déhiscence équatoriale et colorée en vert.

Pour le type Rb : le même phénomène se présente. Mais, différence entre Ra et Rb : au bout de 3 heures, Rb donne tout au plus des diplobacilles, alors que les bâtonnets germinatifs de Ra se sont activement allongés et ont l'aspect de chaînes pouvant se composer de 60 éléments.

2° *Bacillus mesentericus niger* LUNT types Ra et Rb. — Dans les mêmes conditions que ci-dessus, j'ai obtenu :

Pour le type Ra : également après deux heures, des spores en voie de germination équatoriale. Les bâtonnets germinatifs présentaient, au bout de trois heures, le même aspect que pour *B. megatherium* souche CALMETTE type Ra, de chaînes extrêmement longues. Pour le type Rb les spores qui, elles aussi, germent en deux heures, donnaient par déhiscence équatoriale des bâtonnets germinatifs n'allant pas plus loin que le stade diplobacille.

Il est donc nécessaire de souligner les faits suivants :

Des trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI :

a) Seul, *Bacillus lactis niger* GORINI type Rb présente des spores sur gélose inclinée de pH = 7,2.

b) La sporulation a lieu après onze heures et demie environ de séjour à l'étuve à 37° C.

c) La germination de ces spores est équatoriale et s'effectue après deux heures et demie de séjour à l'étuve à 37° C.

d) La germination des spores de *Bacillus megatherium* CALMETTE types

Ra et Rb et celle de *Bacillus mesentericus niger* LUNT types Ra et Rb s'effectue après deux heures de séjour à l'étuve à 37° C. pour les quatre types.

Les bâtonnets germinatifs des types Ra donnent naissance à des chaînes d'éléments allant jusqu'à 60 unités, les types Rb, ne donnent dans le même temps, que des diplobacilles. Tels sont les faits que l'on observe après un séjour de 3 heures à 37° C. Les cultures âgées de 8 heures, ne montrent que des germes isolés, quel que soit le type.

Coloration vitale par la fuchsine formolée.

Le bâtonnet germinatif peut être perçu sans le secours de solution colorante, mais, ainsi que le fait justement remarquer A. MEYER (1), la fuchsine formolée met admirablement en évidence le bâtonnet germinatif. Avec les colorants usuels, la membrane ne se détache pas avec une grande netteté du reste de la plastide. L'addition de formol, tout en diminuant le pouvoir tinctorial de la fuchsine en augmente considérablement l'électivité pour la membrane et les cloisons transversales. C'est la raison pour laquelle j'ai étudié, la sporulation avec la méthode d'Alessandrini, et avec la solution de fuchsine additionnée de formol.

MODE OPÉRATOIRE EMPLOYÉ

J'ai effectué tout d'abord une solution aqueuse de fuchsine basique R. A. L. à 0,10 p. 1.000, à laquelle j'ai ajouté des quantités progressives de *formol Codex*, selon le protocole ci-dessous :

Des tubes *a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k* reçoivent chacun 10 cm³ de la solution, puis j'ajoute au tube *a* 0,5 cm³ de *formol Codex*, au tube *b* 1 cm³, au tube *c* 2 cm³, et ainsi de suite, quant au tube *k*, la quantité de formol ajoutée atteint 10 cm³.

D'autre part, j'effectue 3 suspensions, l'une de *B. lactis niger* GORINI type Ra, l'autre de *B. lactis niger* GORINI type Rb, la troisième de *B. lactis niger* GORINI type S. Ces suspensions renferment environ 4 milliards de germes au centimètre cube. Les cultures, sur gélose inclinée, sont mises à l'étuve à 37° C. pendant 12 heures.

(1) Dans une planche colorée.

Pour chaque type, je répartis 11 cm³ de suspension dans 11 tubes stériles, à raison de 1 cm³ de suspension par tube.

J'ajoute alors au premier de ces tubes 1 cm³ du mélange *a*; au second, 1 cm³ de mélange *b*; au troisième, 1 cm³ de mélange *c*, et ainsi de suite jusqu'au onzième tube qui reçoit 1 cm³ de mélange à parties égales.

Après 5 heures de contact, j'examine entre lame et lamelle pour savoir quelle est la concentration en formol la plus favorable et la plus élective.

Pour l'ensemble des essais, les colorations les plus belles ont été obtenues avec le mélange *c* constitué par 2 cm³ de solution de fuch sine à 0,10 p. 1.000 et 10 cm³ de *formol Codex*.

Une légère centrifugation préalable permet :

1° D'enrichir la suspension en éléments colorés;

2° D'éliminer le liquide coloré et d'examiner le matériel en eau physiologique.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Lorsque l'examen microscopique porte sur un assez grand nombre d'éléments bactériens, j'observe les faits suivants. Tout d'abord, la fuch sine formolée montre non seulement les parois latérales et les cloisons transversales, mais encore, les amorces de cloisonnement décrites par GUILLIERMOND. Ces dernières se perçoivent avec une très grande netteté. La spore, chez une plastide non colorée, a toujours une très grande réfringence, et aux radiations où je l'examinai, elle paraissait avoir un éclat bleuté. L'apparition de la spore n'entraîne pas une modification profonde de la plastide ni l'apparition de figures semblables à celles observées avec *Bacillus butyricus* et *Bacillus tetani*, et nous retrouvons là un fait signalé par GORINI dès 1894.

Dans mes essais, comme dans ceux de mon illustre devancier, M. le Professeur C. GORINI, la spore est en général centrale ou très légèrement « *déportée* » vers une extrémité.

De nombreuses plastides montrent à chaque extrémité une petite condensation qui se colore en rouge. Nous retrouvons donc là, avec un autre colorant, l'existence d'un petit corps figuré sous forme de grain coloré. Il m'est impossible de me prononcer sur sa nature protéique, lipodique ou glucidique.

Quel que soit le colorant utilisé, cette condensation se colore de façon plus intense que le reste de la plastide. Elle est plus chromatique et semble bien jouer un rôle dans la formation de la spore.

Avec la fuchsine formolée, je retrouve donc les résultats analogues à ceux décrits dans le chapitre consacré à la sporulation. De plus, je constate la présence des plasmodèmes déjà signalés par LASSEUR et ses Collaborateurs, et avant lui par A. MEYER et ses élèves. Les bâtonnets germinatifs peuvent rester associés et constituer soit des diplobacilles nombreux chez Rb, soit des chaînes fréquentes et très longues chez Ra (jusqu'à 60 éléments), fréquentes mais plus courtes chez S.

CHAPITRE IV

Etude de la protéolyse du lait par les trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI

On se souvient que la race asporogène de *B. anthracis* est avirulente. Il était donc logique de se demander si nos trois types dissociés se comportaient de la même façon vis-à-vis de leurs fonctions essentielles : la production d'acide lactique, et la coagulation du lait, et secondairement, la maturation des fromages.

Bacillus lactis niger GORINI, type Rb, se développe surtout à la surface des milieux liquides, sous forme d'un voile plissé, le reste de la colonne liquide demeurant sensiblement limpide. Le type S, au contraire, envahit à peu près uniformément la masse liquide. J'étais donc en droit de supposer que les trois types dissociés se comporteraient de façons différentes dans des tubes de lait. C'est ce que tend à démontrer l'expérience suivante :

Dans une série de grands tubes (1,8 cm. de diamètre, 20 cm. de longueur), stérilisés et calibrés, je répartis du lait écrémé, à raison de 10 cm³ par tube. Ces tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 115° pendant trois quarts d'heure. D'autre part, j'aiensemencé les trois types dissociés sur gélose inclinée. Après un séjour de 10 heures à 37° C., j'ai effectué alors trois suspensions renfermant 2.000.000.000 de germes au cm³.

Trois tubes de lait sont consacrés à l'étude de chaque type et reçoivent 2/10 de cm³, chacun, de suspension bactérienne.

Dans chacun de ces tubes, la hauteur de la colonne de lait atteint 6 cm.

J'ai résumé ci-dessous mes observations. Il est à remarquer qu'au bout de 24 heures, l'action des plastides sur le lait n'est pas sensible. Voici ensuite, jour par jour, l'évolution des faits observés :

Après 48 heures. — Rien pour Ra et Rb. S : peptonisation en surface sur une hauteur de 1 cm.

Après 4 jours. — Ra: peptonisation sur 1/2 à 1 cm. au-dessus du lait. Même remarque pour Rb. S: peptonisation en surface sur une hauteur de 2,7 cm.: cette peptonisation se manifestant par la présence d'un liquide clair divisé en trois couches nettement séparées surmontant le lait non attaqué.

Après 5 jours. — Peptonisation d'une valeur de 1 cm. pour Ra, et d'une valeur de 1 cm 1/2 pour Rb; le lait non attaqué est d'apparence légèrement grenue. S: peptonisation sur 3 cm., se manifestant comme ci-dessus, par un liquide clair divisé en trois couches de plus en plus jaunes. Le lait non attaqué est également grenu.

Après 6 jours. — Ra: peptonisation sur 10-20 mm., liquide clair et séparé en deux couches; lait non attaqué d'apparence grenue, moins nette que pour Rb et S. Rb: peptonisation sur 2 cm., divisée en trois couches. S: peptonisation sur 4 cm. 5, divisée en quatre couches de plus en plus sombres.

Après 7 jours. — Ra: liquide clair sur 15 mm., puis une couche de liquide blanc, épais, sur 2 cm., enfin lait non attaqué d'apparence grenue. Rb: peptonisation sur 2 cm. 5, se manifestant par un liquide clair divisé en trois couches. Lait non attaqué d'apparence grenue. S: peptonisation sur 5 cm. divisée en cinq couches de plus en plus sombres. Il ne reste que 2 cm³ au plus de lait non attaqué, d'apparence grenue.

En résumé, il est à noter dans cette étude que *B. lactis niger* Gorini type S, en 7 jours, peptise le lait sur 5 cm., alors que, dans le même temps, Rb ne le peptise que sur 2 cm. 5, et Ra sur 1 cm. 5.

Ce résultat est tout à fait logique, si l'on veut bien se rappeler que la souche S semble être celle qui se contente de la tension d'oxygène la plus faible. Elle se développe dans le volume entier d'un tube de bouillon, et par suite elle est la mieux placée pour attaquer dans la plus grande proportion le lait dans lequel on l'aensemencée. *B. lactis niger* GORINI types Rb et Ra ont une action beaucoup moins marquée et il s'agit bien là d'un caractère différentiel, qui n'est d'ailleurs valable que pour le lait écrémé, comme nous le constaterons par la suite.

L'étude de l'action des trois types dissociés sur le lait *écrémé et stérilisé* présente en effet une cause d'erreur. La stérilisation à 110° C. empêche de voir la coagulation, qui pour un Bacille lactique doit précéder logiquement la peptisation. C'est pour éviter cet écueil que j'ai cru bon d'employer le *lait pasteurisé*: 1° en tubes, pour avoir un élément de comparaison avec le *lait stérilisé*; 2° en vases d'Erlenmeyer pour favoriser le contact du lait avec l'atmosphère. J'ai pu, à la faveur de ces expériences, constater la formation du coagulum, que je n'avais pas obtenue dans l'étude précédente, et cela pour les trois types dissociés. Ce coagulum, de

la valeur de la moitié du volume total du laitensemencé, lisse en surface, de couleur jaune, d'odeur assez agréable, rappelant le beurre, flottait sur un liquide transparent, d'où montaient continuellement des bulles gazeuses. Ces bulles soulevaient la surface du caillot et donnaient à la partie inférieure de ce dernier un aspect comparable à celui des blancs d'œufs battus en neige.

Mais, on ne constatait aucune différence pour les trois types, ni dans l'aspect des cultures, ni dans la quantité d'acide lactique formé.

Il m'a paru intéressant de doser l'acide lactique formé, d'abord aux dépens du lait écrémé stérilisé, ensuite aux dépens du lait pasteurisé, par les trois souches dissociées de *Bacillus lactis niger* GORINI.

RÉSULTATS OBTENUS

a) *Dosage de l'acide lactique du lait écrémé stérilisé*: après 8 jours d'étuve.

J'ai employé pour le dosage de l'acide lactique la méthode acidimétrique de DENIGÈS, CHELLE et LABAT, que je vais rappeler brièvement:

A 20 cm³ de lait, j'ajoute 2 gouttes de phénolphtaléine en solution alcoolique. Je fais alors tomber la soude $\frac{N}{10}$ jusqu'à coloration rose.

J'obtiens un chiffre A de soude $\frac{N}{10}$; la formule $X = \frac{90}{100.000} \times$

$A \times \frac{1.000}{20}$ me donne la quantité d'acide lactique pour un litre de lait.

Un premier dosage m'a donné les résultats suivants:

Ra: 3,375 p. 1.000 d'acide lactique;

Rb: 4,05 p. 1.000;

S: 4,725 p. 1.000.

Mais la teinte rose était peu visible. Pour pallier à cet inconvénient, j'ai procédé à la centrifugation du lait et j'ai opéré le dosage de l'acide lactique sur le liquide clair surmontant le culot de centrifugation. J'ai alors obtenu les chiffres suivants:

Ra: 2,340 p. 1.000 d'acide lactique;

Rb: 2,790 p. 1.000;

S: 4,140 p. 1.000.

Comme on le voit, ces chiffres diffèrent sensiblement de ceux obtenus dans le dosage précédent. Néanmoins, un fait se retrouve dans les deux dosages, et il est en harmonie avec les constatations faites sur l'aspect des tubes de lait: S est plus grand producteur d'acide lactique que Rb, qui lui-même précède légèrement Ra dans cette production. Il ne faut voir dans ces nombres qu'une première approximation et non pas des résultats rigoureux. Dans le premier dosage la couleur rose est difficile à percevoir. Dans le second, il est possible que le culot de centrifugation ait retenu une certaine quantité d'acide lactique.

b) *Dosage de l'acide lactique du lait pasteurisé*, après 4 jours d'étuve en vases d'Erlenmeyer.

Soumis au même dosage que les tubes de lait stérilisé, le lait pasteurisé contenu dans les vases d'Erlenmeyer a donné 83,5 cm³ de soude N

$\frac{N}{10}$ pour une prise d'essai de 100 cm³ de lait, ce qui correspond à 7,515 p. 1.000 d'acide lactique. Il est à noter:

- 1° Que cette quantité est la même pour les trois types;
- 2° Qu'elle est supérieure à la quantité d'acide lactique obtenue pour le lait stérilisé en tubes;
- 3° Que sa formation est beaucoup plus rapide, puisque cette quantité est obtenue au bout de 4 jours, alors qu'il en faut 8 pour obtenir dans les tubes de lait stérilisé une quantité moitié moindre d'acide lactique.



CHAPITRE V

Protéolyse de la gélatine

par les trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI

Les Bactériologistes s'efforcent de classer les Bactéries en groupes. Certains caractères permettent d'effectuer des divisions. C'est ainsi qu'en première approximation, on peut diviser les Bactéries en « *Bactéries liquéfiant la gélatine* » et en « *Bactéries se développant sans modifier l'aspect du milieu de culture* ».

Malheureusement, il en est de la liquéfaction de la gélatine comme d'un grand nombre de caractères biologiques : leur importance varie considérablement avec les conditions de l'expérience, ou, en d'autres termes, les causes d'erreur sont extrêmement nombreuses en Biologie. Ainsi, pour tout Bactériologiste, digne de ce nom, le *Staphylocoque* liquéfie la gélatine, et cependant il n'est pas rare de trouver des souches de *Staphylococcus albus* qui, ensemencées sur peptone gélatinée, ne modifient sensiblement pas l'aspect du milieu de culture. Au lieu de l'entonnoir de liquéfaction en « *doigt de gant* » classique pour *Staphylococcus aureus*, on observe tout au plus la présence d'une toute petite cupule au point d'ensemencement, et encore celle-ci peut-elle faire défaut si le pH, la température, ou la composition du milieu de culture, ne sont pas éminemment favorables à la liquéfaction. Aussi, la nécessité de mesurer l'intensité de la liquéfaction est-elle rapidement apparue aux Bactériologistes.

En 1904, G. MALFITANO introduit la technique des tubes de Mett dans la mesure du pouvoir protéolytique. Eleonora LAZARUS, en 1910, utilisait des tubes calibrés de 2 mm. gradués pour préciser l'importance de la protéolyse par la *Bactéridie charbonneuse*, et en particulier l'influence des ions H^+ et OH^- sur le processus bactérien. Nous voyons ainsi que les facteurs d'action qui interviendront dans la protéolyse tiendront à la concentration des milieux nutritifs, à leur composition, à leur teneur en certaines substances, notamment en ions H^+ et OH^- .

Recherches nouvelles

TECHNIQUE

L'étude de la protéolyse peut être ramenée à deux schémas.

a) Dosage des produits d'hydrolyse de la molécule protéique (DE WÆLE et VANDEVELDE, 1905, et A. DUPAIX, 1933).

b) Mesure de la colonne de gélatine liquéfiée (MALFITANO, 1904).

c) Appréciation grossière à l'œil de la liquéfaction en piqûre.

Par suite de la production de voiles très cohérents avec certains types de *Bacillus lactis niger* GORINI, et notamment avec le type Rb, je n'ai pu appliquer la technique habituelle qui consiste à employer les tubes de Mett, et j'ai dû modifier le procédé ordinairement utilisé pour la mesure de la protéolyse.

J'ai employé, pour cette étude, des tubes de 15 cm. de long et de 3,5 mm. de diamètre intérieur et 5 mm. de diamètre extérieur, stérilisés au four Pasteur. Je les ai aseptiquement remplis de gélatine sur 10 cm. de hauteur. Une fois la gélatine refroidie, j'ai déposé à la surface une goutte de suspension bactérienne, et j'ai rebouché les tubes avec un tampon de coton flambé.

Le tableau suivant permet de noter les différences de vitesses de liquéfaction des trois types.

TABLEAU VI

	Ra	Rb	S
	—	—	—
<i>Après 3 jours:</i>			
1 ^{er} tube.	2 mm.	1 mm.	4 mm.
2 ^e tube	2 mm.	1 mm.	3,5 mm.
<i>Après 17 jours:</i>			
1 ^{er} tube.	9 mm.	12 mm.	13 mm.
2 ^e tube	9 mm.	12 mm.	14 mm.

L'expérience montre que les trois types dissociés possèdent un pouvoir protéolytique différent. Ce pouvoir protéolytique, très voisin pour Rb et S, est légèrement inférieur pour Ra.

La protéolyse chez les trois souches microbiennes peut se différencier, non seulement par son intensité, mais encore par la forme de la figure de liquéfaction. Avec les formes dissociées étudiées, les différences sont surtout nettes au bout de 48 heures.

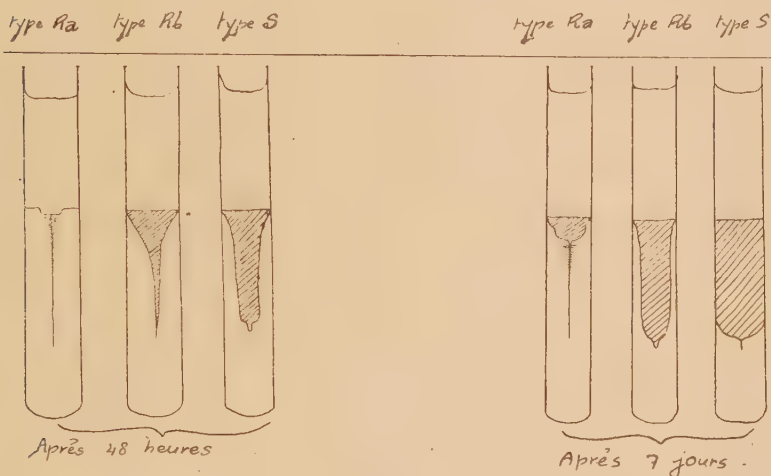


Fig. 5

Les résultats obtenus dans l'étude morphologique de la liquéfaction de la gélatine nous montrent que le type S semble le plus liquéfiant, puisque en 7 jours, les 3/4 supérieurs du tube sont complètement protéolysés. Dans le même temps, le type Rb donne autour de la piqûre une zone de liquéfaction en doigt de gant, alors que la liquéfaction pour Ra se limite à une cupule. Ces résultats sont en complet accord avec l'expérience précédente et, également avec l'aspect de la végétation des trois types sur milieu liquide et sur lait, puisque, dans toutes ces expériences, le type S semble le plus capable d'envahir le volume total du milieu nutritif.

CHAPITRE VI

Influence du pH sur la végétation des trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI

Tous les Bactériologistes savent que certains germes tels que les Bacilles dysentériques exigent des milieux sensiblement neutres, tandis qu'au contraire les Bacilles lactiques se contentent de liquides nettement acides. D'autres Bactéries peuvent se développer sur le milieu de DIEUDONNÉ (sang potassé). Toute une série d'auteurs et notamment SIERAKOWSKI (1923), CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN (1923), KOPACZEWSKI (1930-31), LASSEUR, M. OLIVIER, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (1930), LASSEUR, FRIBOURG et GROSJEAN (1932), ont déterminé les pH limites et les pH optima de végétation de toute une série de microorganismes.

SIERAKOWSKI est allé plus loin. Pour ce savant, les Bactéries, lorsqu'elles se développent dans un milieu de pH non favorable, mais cependant « compris » dans la zone des pH qui permettent la végétation, tendent à le ramener vers le pH optimum.

LASSEUR et ses Collaborateurs ont observé des faits analogues. Ils ont notamment constaté que *Bacillus chlororaphis* S, *Bacillus chlororaphis* Rb 1, *B. chlororaphis* Rb 2, et *B. chlororaphis* Ra ne se comportaient pas de la même façon. C'est ainsi qu'avec *B. chlororaphis* S, le pH reste sensiblement constant, pour des milieux dont le pH origine varie de 7,4 à 7,10, tandis qu'avec les formes Ra et Rb, on observe une acidification. Ce sont ces faits qui m'ont conduit à étudier d'une façon assez précise les variations du pH chez les trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI (1).

(1) Pour toute la question bibliographique, je renvoie le Lecteur aux publications du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy où de nombreuses recherches ont été effectuées, telles que l'influence du pH sur la chromogénèse, du pH sur la végétation, du pH sur la forme des colonies, etc...

TECHNIQUE EMPLOYÉE

Contrairement à la technique utilisée au Laboratoire, qui consiste à ajouter des solutions-tampons, j'ai obtenu des pH variables par addition de soude pour les pH alcalins et d'acide lactique pour les pH acides.

J'ai d'abord effectué une solution de peptone à 20 p. 1.000, dont j'ai pris le pH par la méthode électrométrique. Le pH obtenu a été ajusté à 6,2, chiffre choisi volontairement pour qu'après passage à l'autoclave le pH soit ramené à une valeur voisine de 6. A partir de ce pH = 6, j'ai établi des pH supérieurs et inférieurs par addition rationnelle d'acide lactique pour les pH inférieurs, et de soude pour les pH supérieurs. J'ai obtenu ainsi une gamme de pH qui s'établissait comme suit : 3,12, 4,08, 5,09, 6,2, 7,18, 8,15. Après précipitation de l'eau peptonée à l'autoclave, filtration et stérilisation, ces pH ont été amenés aux chiffres suivants : 3,84, 4,66, 5,51, 6,45, 7,10, 7,50. Le dernier n'étant pas suffisamment différencié, je l'ai remplacé par une eau peptonée de pH 8,09 après stérilisation et précipitation (1). J'obtiens ainsi 6 séries *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*. *A* correspondant à 3,84..., *F* à 8,09.

Les séries *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* sontensemencées avec les trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI. Chaque série estensemencée à 5 exemplaires.

L'étude effectuée a porté sur deux points :

1° Modifications du pH par les plastides ;

2° Influence du pH sur la végétation.

MODIFICATIONS DU pH PAR LES PLASTIDES

Remarquons en première approximation que les pH = 3,84 et 4,66 (pH très acides) ne permettent pas la végétation et ne figureront ni dans le tableau ni dans le graphique.

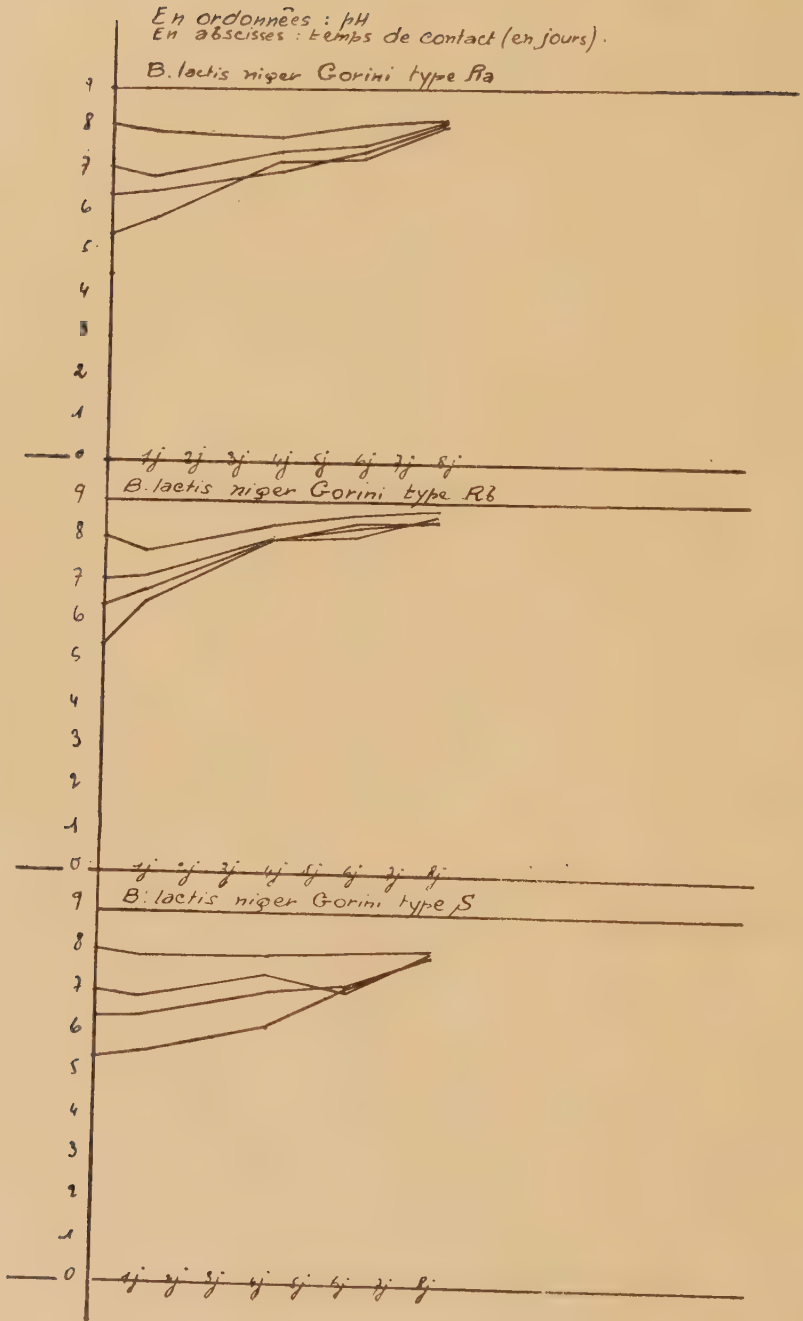
J'ai fait figurer dans le tableau ci-dessous les modifications des pH en fonction du temps, et 4 courbes permettent au lecteur de se représenter le phénomène. Il est bien entendu qu'entre chaque expérience, les tubes sont mis à l'étuve à 37° C.

(1) Ces pH ont été pris avec l'aide de mon camarade MOULIN, auquel je suis heureux d'exprimer ici mes remerciements.

TABLEAU VII

Temps d'étude à 37°	pH de départ	pH modifiés		
		Ra	Rb	S
24 heures	— 5,51	— 5,93	— 6,63	— 5,72
	— 6,45	— 6,61	— 6,79	— 6,53
	— 7,10	— 6,92	— 7,23	— 6,96
	— 8,09	— 7,97	— 7,78	— 7,94
4 jours	— 5,51	— 7,30	— 8,08	— 6,30
	— 6,45	— 7,12	— 8,11	— 7,06
	— 7,10	— 7,53	— 8,13	— 7,58
	— 8,09	— 7,94	— 8,49	— 7,96
6 jours	— 5,51	— 7,37	— 8,52	— 7,25
	— 6,45	— 7,61	— 8,44	— 7,30
	— 7,10	— 7,75	— 8,26	— 7,21
	— 8,09	— 8,20	— 8,69	— 8,06
8 jours	— 5,51	— 8,11	— 8,60	— 7,98
	— 6,45	— 8,16	— 8,62	— 7,98
	— 7,10	— 8,17	— 8,74	— 8,06
	— 8,09	— 8,25	— 8,78	— 8,21

Fig. 6



RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Comme dans les recherches consacrées à *Bacillus chlororaphis* par LASSEUR et ses Collaborateurs, j'ai constaté une acidification des milieux alcalins et une alcalinisation des milieux acides, ces deux faits semblant destinés à amener les pH à une concentration favorable. A partir de cette concentration, les modifications du milieu semblent indépendantes du milieu initial. Si les différences de comportement entre les trois types dissociés ne sont pas considérables, il paraît bien, néanmoins, que l'on puisse classer les germes dans l'ordre suivant :

Rb, le plus alcalinisant (pH = 8,78);

Ra, (pH = 8,25);

S, (pH = 8,21).

Les pH de Ra et de S sont suffisamment rapprochés pour qu'il ne soit pas trop osé de ma part de constituer ici également les deux groupes **déjà rencontrés: Ra-S et Rb.**

Relation entre le pH et l'aspect des cultures de *Bacillus lactis niger* GORINI

Il m'a paru intéressant de noter, en même temps que les modifications du pH par les plastides, les modifications d'aspect des cultures en eau peptonée en fonction du pH. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont rassemblés dans les trois tableaux ci-dessous.

Les pH = 3,84 et 4,66, ne permettant pas la végétation, ne figureront pas dans ces tableaux.

(1) L'éminent Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux, M. L. GÉNEVOIS, a beaucoup étudié les questions de pH et de rH. Rappelant les travaux de R. WURMSER et de N. MAYER REICH (1933), L. GÉNEVOIS et T. NICOLAIEV ont étudié « le potentiel d'oxydo-réduction de la fermentation lactique bactérienne ». Ainsi que le font justement remarquer ces deux savants, il ne devrait pas y avoir théoriquement production d'acide lactique en aérobiose. En effet, l'expérience montre que la formation d'acide lactique est nulle ou très faible par rapport à la formation d'acide lactique anaérobie. « Tout se passe comme si les ferments lactiques étaient incapables de donner de l'acide lactique au contact de l'oxygène, ainsi que le veut l'application des lois de l'équilibre thermodynamique ».

TABLEAU VIII

B. lactis niger GORINI Ra.

pH

Temps	5,51	6,45	7,10	8,09
—	—	—	—	—
24 heures	Trouble uniforme. Filaments blancs. Précipité d'apparence visqueuse.	Cf. 5,51, mais caractères encore plus nets.		Cf. 5,51.
48 heures	Trouble homogène. Filaments blancs.	Cf. 5,51	Trouble homogène. Filaments blancs. Flocons.	Trouble homogène. Filaments blancs très longs, d'apparence visqueuse.
4 jours	Liseré blanc 1 ^{mm} . Trouble homogène. Filaments blancs.	Liseré léger. Trouble homogène. Filaments blancs.	Liseré peu import. Trouble léger. Filaments et flocons.	Liseré très peu import. Filaments très longs. Trouble léger.
5 jours	Comme après 4 jours.	Comme après 4 jours.	Comme après 4 jours.	Liseré net. Filaments longs. Trouble léger.

TABLEAU IX

B. lactis niger GORINI Rb:

pH

Temps	5,51	6,45	7,10	8,09
—	—	—	—	—
24 heures	Trouble homogène. Voile grim pant sur 8 à 10 millimètres.	Trouble abondant sur tout sous le voile grim pant sur 3 à 4 ^{mm} .	Trouble abondant surtout sous le voile grim pant sur 4 à 5 mm.	Trouble homogène et flo-cons. Simple pellicule.
48 heures	Voile grim pant sur 1 cm. boursoufflé, pigmenté. Liquide clair.	Voile grim pant sur 3-5 mm. boursoufflé, pigmenté. Liquide trouble.	Voile grim pant sur 5 ^{mm} 1 ^{er} cm. de liquide trouble. Liquide clair.	Voile peu consistant grim pant sur 2-3 mm. non pigmenté. Liquide trouble.
4 jours	Voile grim pant sur 12-12 mm. boursoufflé très pigmenté. Liquide clair.	Voile grim pant sur 6-7 mm. boursoufflé. Pigment brun. Liquide trouble homogène.	Cf. 6,45.	Voile grim pant sur 3 mm. Pas de pigment. Liquide trouble.

Après 4 jours l'aspect des cultures ne se modifie pas.

TABLEAU X

B. lactis niger GORINI S :

pH

Temps	5,51	6,45	7,10	8,09
—	—	—	—	—
24 heures	Trouble homogène ni voile ni précipité.	Cf. 5,51.	Cf. 5,51.	Comme 5,51 mais trouble plus léger.
48 heures	Trouble homogène. Liséré blanc.	Trouble blanc.	Trouble homogène. Liséré très faible.	Trouble léger. Filaments blancs. Pas de liséré.
4 jours	Lisé blanc sur 1-2mm. Trouble homogène. Filaments.	Lisé blanc sur 2 mm. Trouble homog. Filaments.	Lisé sur 1-2mm. Trouble homog. Filaments.	Lisé assez net. Trouble léger. Filaments.
5 jours	Comme après 4 jours.	Comme après 4 jours.	Comme après 4 jours.	Comme après 4 jours.

Ces recherches montrent que les trois types présentent à $\text{pH} = 5,51$ la végétation la plus intense. $\text{pH} = 8,09$ permet la végétation, sans la favoriser de façon aussi nette. Par contre, $\text{pH} = 3,84$ et $\text{pH} = 4,66$ l'interdisent complètement.

—:—

CHAPITRE VII

Influence des antiseptiques sur la végétation des trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI

Nous avons déjà vu que DUCLAUX, en 1898, montrait la difficulté qu'il y avait à établir une démarcation nette entre l'aliment et l'antiseptique. Il n'en reste pas moins que toute une classe de substances s'oppose au développement microbien, à des concentrations très faibles, et qu'elle est considérée par les Bactériologistes comme antiseptique, c'est-à-dire capable de modifier la croissance, la forme, le pouvoir chromogène, la virulence, etc... Et sans vouloir énumérer les milliers de publications qui ont été consacrées à l'action des antiseptiques, sur les Bactéries, je rappellerai cependant certaines recherches qui, soit par leur antériorité, soit par leurs idées nouvelles, se détachent nettement des travaux qu'on est habitué de lire à ce sujet. Je cite donc les recherches de R. KOCH (1881), MIQUEL (1884), KRÖNIG et PAUL (1887), VINCENT (1907, 1908, 1931 et 1932), MADSEN et NYMAN (1907), BOHN et DRZEWINA (1920), RIDEAL et WALKER (1921), BOAS (1927), HOLLANDE et G. CRÉMIEUX (1928), RÉGNIER et LAMBIN (1931), BECHHOLD (1919-1937), SERRA (1931). Je m'excuse si, pour des raisons de simplicité typographique, je suis obligé de supprimer un grand nombre de noms d'auteurs.

Je vais étudier successivement l'action :

1° De SO^4Cu 5 H^2O ;

2° Du phénol ;

sur les trois types dissociés de *B. lactis niger* GORINI.

A) Action des sels de cuivre sur les trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI

Dès 1893 (DRESER), nous voyons se préciser le parallélisme entre le pouvoir antiseptique et la dissociation électrolytique, et je rappellerai ici les travaux de KAHLENBERG et TRUE (1896), HEALD (1896), PAUL et KRÖNIG (1896), MAILLARD (1899), BIAL (1902) et Victor HENRI (1906).

On sait que pour certaines substances la dissociation des sels est plus forte que pour d'autres. C'est ainsi que pour HCl, on admet facilement une constante de dissociation égale à 100, tandis qu'avec d'autres acides, on obtiendra des chiffres de l'ordre de 25 (acide dichloracétique), de 19 (acide oxalique) de 1,7 (acide citrique). Or, il est possible de modifier la dissociation d'un homoïonique. Dans des recherches restées classiques, effectuées par un savant nancéen, MAILLARD, le pouvoir antiseptique de SO^4Cu à l'égard du *Penicillium* décroît à mesure que croît la quantité de sulfate de soude apportée, et je cite ici le tableau de MAILLARD qu'à si clairement exposé Victor HENRI dans son « *Cours de Chimie-Physique* » (1906).

SO^4Cu 1/3 N	après 35 jours, le poids de la culture est.....	0,0116 gr.
— 1/4 N	—	0,0442 gr.
— 1/5 N	—	0,0505 gr.
— 1/10 N	—	0,0649 gr.
— 1/10 N + SO^4Na^2 1/10 N	après 35 j., le poids de la culture est	0,0727 gr.
— 1/10 N + SO^4Na^2 1/5 N	—	1,5582 gr.
— 1/10 N + SO^4Na^2 3/10 N	—	2,1771 gr.

Je me suis contenté de chercher quelles étaient les doses de sulfate de cuivre qui exerçaient :

1° Une action infertilisante;

2° Une action mortelle;

sur les trois types dissociés.

Recherches nouvelles

A) MODE OPERATOIRE

1° OBTENTION DE CULTURES PURES

Comme pour les recherches précédentes, les suspensions (1) qui ont servi aux ensemencements ont été obtenues sur géloses inclinées de $\text{pH} = 7,2$, mises à l'étuve à 37° pendant 12 heures.

(1) 2.000.000.000 de germes au cm^3 .

2° SOLUTION DE SULFATE DE CUIVRE

La solution de sulfate de cuivre employée a été faite dans un vase d'Er-lenmeyer stérile, puis filtrée sur papier Chardin et stérilisée à nouveau, à l'autoclave. Cette solution renfermait 5 grammes de sulfate de cuivre (SO_4Cu , 5 H_2O) pour 100 cm^3 d'eau bi-distillée.

Le milieu nutritif auquel j'ai ajouté le sulfate de cuivre était constitué par de l'eau peptonée à 20 p. 1.000 (pH = 7,2) précipitée, puis filtrée, enfin stérilisée à l'autoclave. Le protocole d'addition du sulfate de cuivre est analogue à celui utilisé par S. BIDZINSKI (1926). Je rappelle ci-dessous ce protocole.

	Eau pept.	Eau φ	SO_4Cu à 5 %	Susp. bact.	Concent. 0/00
	—	—	—	—	—
A	7 cm^3	1,950 cm^3	0,050 cm^3	1 cm^3	0,250
B	7	1,925	0,075	1	0,375
C	7	1,900	0,100	1	0,500
D	7	1,875	0,125	1	0,725
E	7	1,850	0,150	1	0,750
F	7	1,800	0,200	1	1,000
G	7	1,750	0,250	1	1,250
H	7	1,700	0,300	1	1,500
J	7	1,600	0,400	1	2,000
J	7	1,500	0,500	1	2,500
T	7	2,000	0	1	0

L'eau physiologique n'a qu'une raison d'être. Celle de ramener à un volume total et uniforme de 10 cm^3 le contenu de chaque tube.

Il est bien entendu que j'ai utilisé pour répartir les quantités précitées d'eau peptonée, d'eau physiologique, de sulfate de cuivre à 5 % et de suspension bactérienne, la technique habituelle du Laboratoire de Microbiologie, qui consiste à opérer, à l'abri des poussières atmosphériques, et n'employer que des pipettes graduées au 1/20, stérilisées au four Pasteur, j'ai changé de pipette à chaque solution distribuée (1).

(1) Il est très important d'effectuer le mélange homogène de l'antiseptique et du milieu nutritif sans quoi l'antiseptique tombe au fond du tube, et ne gêne en rien la végétation ce qui constitue une importante cause d'erreur,

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

a) Détermination de la dose infertilisante

Après 16 heures d'étuve à 37° C., je n'ai constaté, dans les tubes ensemencés avec *Bacillus lactis niger* GORINI, type Ra et type S, et ayant reçu du sulfate de Cuivre dans les proportions énumérées ci-dessus, aucune végétation.

Les tubes témoins montraient :

Culture type Ra: des flocons abondants, un trouble uniforme léger du liquide, et un voile ténu, d'où partaient des trainées d'apparence visqueuse.

Culture type S: un développement en surface extrêmement ténu, tombant dans le liquide sous forme de longs filaments blanchâtres.

Culture type Rb, à la concentration 0,250, que nous désignerons pour plus de commodité par la lettre A, figurant au protocole en face de cette concentration, j'ai constaté la présence d'un voile grimpant peu consistant, d'un trouble homogène du tube, et de quelques flocons.

Tube B, un voile grimpant peu consistant, un trouble homogène léger, et des flocons rares et petits.

Tube C, une végétation semblable à celle de B.

Tube D, un liseré blanc sur le tube au-dessus du liquide, pas de voile, ni de trouble important.

Le tube témoin montrait un voile grimpant sur 5 mm., le liquide sous-jacent étant à peu près clair.

Après 48 heures d'étuve à 37° C., les cultures présentaient les aspects figurant dans le tableau suivant.

TABLEAU

TABLEAU XI

	Ra	Rb	S
A	Trouble assez important. Flocons.	Voile remontant chagriné. Trouble considérable.	Filaments blanchâtres Trouble léger.
B	Trouble assez important. Quelques flocons.	Voile remontant chagriné. Trouble important.	Rares filaments blancs. Tr. très léger.
C	<i>Liquide clair.</i>	Voile remontant chagriné. Trouble léger.	<i>Liquide clair.</i>
D	id.	Pas de voile. Trouble du liquide.	id.
E	id.	<i>Liquide clair.</i>	id.
G	id.	id.	id.
H			
I			
J			
T	Flocons abond. Trouble du liquide. Voile ténu tombant en trainées dans le liquide sous-jacent.	Voile grimpant peu consistant haut de 5 mm. Pas de trouble.	Développement en surface très ténu tombant dans le liquide sous forme de long filament blanc.

Après 10 jours d'observation, je n'ai constaté aucune apparence de végétation dans les tubes restés clairs après 48 heures d'étuve à 37° C. Nous arrivons aux concentrations infertilisantes suivantes :

Type Ra: 0,5 0/00 de SO^4Cu .

Type Rb: 0,75 0/00 de SO^4Cu .

Type S: 0,5 0/00 de sulfate de cuivre.

Ces doses me permettent de classer les trois types dissociés en deux groupes : Ra-S et Rb.

b) Détermination de la dose mortelle de SO^4Cu

Pour trouver la dose mortelle de sulfate de cuivre, j'ai réensemencé sur eau peptonée tous les tubes qui n'avaient pas poussé dans l'expérience précédente.

Après 48 heures d'étuve à 37° C., j'ai fait les observations suivantes :

Type Ra: tous les tubes présentent un trouble liquide, avec flocons et

filaments blanchâtres. Pour les deux concentrations les plus faibles (0,5 et 0,725), voile extrêmement ténu.

Type Rb: tous les tubes présentent un voile remontant à plis très profonds et bourrelets extrêmement nets; l'action de l'antiseptique semble avoir été de renforcer les caractères spécifiques du type.

Type S: tous les tubes présentent un trouble, léger pour les concentrations de 2 et 2,5 pour mille; les autres concentrations présentent en outre un voile d'apparence visqueuse tombant aisément au fond en trainées blanchâtres.

Le protocole précédent ne permet donc pas d'atteindre les doses mortelles de sulfate de cuivre. J'en ai donc établi un second que j'expose ci-après.

	Eau peptonée	Eau physiol.	Phénol à 5 %	Suspens.	Concentr. °/oo
	—	—	—	—	
a	7 cm ³	1,4 cm ³	0.6 cm ³	1 cm ³	3
b	7	1,2	0,6	1	3
c	7	1	1	1	5
d	7	0,8	1,2	1	6
e	7	0,6	1,4	1	7
f	7	0,4	1,6	1	8
g	7	0,2	1,8	1	9
h	7	0	2	1	10
T	7	2	0	1	0

Après 24 heures, ces tubes ne présentaient aucune apparence de végétation. Donc la dose infertilisante était bien atteinte dans l'expérience ci-dessus. Réensemencés sur milieu neuf (eau peptonée à 2 %), ces tubes présentaient après 24 heures :

Type Ra: A la concentration de 3 pour mille (a), on observe un trouble homogène très net et quelques flocons; à la concentration de 4 pour mille (b) on perçoit un trouble homogène plus faible, mais néanmoins très visible, et quelques rares flocons; le tube c est absolument clair.

Le témoin présente un voile d'apparence visqueuse tombant dans le liquide en longs filaments, et un trouble des 2/3 supérieurs du milieu nutritif.

Type Rb: tous les tubes réensemencés présentaient un voile remontant plissé et un trouble homogène, ainsi que des flocons abondants.

Le témoin présentait le même aspect.

Type S: les tubes réensemencés ne montraient aucune apparence de végétation.

Le témoin présentait un trouble du liquide des 2/3 supérieurs et des flocons abondants.

Cette expérience nous montre que:

La forme dissociée Ra ne supporte pas 5 p. 100 de SO^4Cu ;

Bacillus lactis niger GORINI S, plus sensible encore ne supporte pas 3 p. 100 de SO^4Cu ;

Alors que le type Rb n'est pas tué même par 10 p. 100 de SO^4Cu .

Ceci n'est pas pour nous surprendre, puisque le type Rb présente des formes de résistance, et, BIDZINSKI, dans sa thèse faite au Laboratoire (1926) constatait déjà « que la membrane des spores semble imperméable au sulfate de cuivre ».

Une expérience ultérieure devait d'ailleurs me prouver que des spores de la forme dissociée Rb ayant subi l'action du sulfate de cuivre (solution à 20 %) et réensemencées sur eau peptonée, « repartaient » sans avoir paru souffrir de leur contact avec l'antiseptique.

Les résultats obtenus dans l'étude des doses mortelles nous permettent donc de retrouver les deux groupes déjà signalés au sujet des doses infertilisantes: d'une part les types Ra et S, d'autre part, le type Rb.

2° Je viens de décrire l'action du sulfate de cuivre sur la végétation de *Bacillus lactis niger* GORINI. Je vais maintenant schématiser les modifications de forme que peuvent offrir les trois types dissociés sous l'action de cet antiseptique.

Avec le type S en général les plastides sont isolées ou réunies en diplobacilles, tandis que les éléments bactériens des types Ra et Rb restent accolés en chaîne de cinq à treize éléments pour Rb et de six à vingt éléments pour Ra. La modification la plus importante que l'on observe semble être l'apparition de formes très petites, de colorabilité faible. La modification des dimensions est surtout sensible sur le diamètre du cylindre. Un lecteur non prévenu pourrait être tenté de ramener à une impureté la présence de ces plastides modifiées, mais je ne suis pas le seul auteur qui ait fait cette remarque, car déjà A. DUPAIX (1933) avait observé des faits analogues avec *Bacillus caryocyanus*.

Action comparative du phénol sur les trois types dissociés

Dans une première série d'expériences nous sommes arrivés à classer les trois types dissociés en deux groupes Ra-S et Rb, qu'il s'agisse des

doses mortelles ou des doses infertilisantes. Avec le phénol, seule la dose mortelle permet d'établir cette même classification.

Lorsqu'il s'agit de déterminer la dose infertilisante on est obligé de comparer l'action d'une substance vis-à-vis de l'espèce microbienne expérimentée, mais aussi à l'égard de Bactéries qui depuis de longues années ont servi de matériel pour l'étude du pouvoir antiseptique, c'est ainsi que j'ai été amené à étudier l'action du phénol sur *B. pyocyannique* PeA de la collection du Laboratoire de Microbiologie et à constater que la dose infertilisante trouvée (1 pour mille), et la dose mortelle (1,5 pour mille) étaient à peu de chose près les mêmes que celles publiées par J.-G. MAR-CHAL (1932).

Dans l'étude du pouvoir antiseptique deux choses sont à considérer :

1° Evaluer le pouvoir toxique d'une substance par rapport à celui d'une autre substance parfaitement bien étudiée, c'est ce que l'on fait fréquemment dans les pays de langue anglaise lorsqu'il s'agit de déterminer l'action bactéricide du phénol (A. DUPAIX, 1933).

2° Afin de se familiariser avec la technique qu'il aura à utiliser l'auteur a toujours intérêt à étudier une même substance non seulement sur les espèces microbiennes, mais encore sur une Bactérie qui a fait l'objet de très nombreux travaux. Et c'est pour cela que j'ai rapporté un peu plus haut les résultats obtenus avec le *B. Pyocyannique* PeA.

Recherches nouvelles

a) TECHNIQUE EMPLOYÉE

1° L'obtention de cultures pures a été réalisée à l'aide du procédé décrit antérieurement (1).

2° Solution de phénol. — Elle a été effectuée dans un vase d'Erlenmeyer, stérilisé au four Pasteur et renferme 5 grammes de phénol MERCK dissous dans 100 cm³ d'eau bi-distillée.

3° Le milieu nutritif était constitué, comme pour l'étude précédente, par de l'eau peptonée à 20 p. 1.000, de pH = 7,2.

(1) Voir l'action du Sulfate de Cuivre sur *B. lactis niger* GORINI.

4° Pour la répartition de l'antiseptique, j'ai utilisé le protocole suivant :

	Eau peptonée	Eau physiol.	Phénol à 5 %	Suspens.	Concentr. 0/00
	—	—	—	—	—
A	7 cm ³	1,975 cm ³	0,025 cm ³	7 cm ³	0,125
B	7	1,950	0,050	1	0,125
C	7	1,925	0,075	1	0,375
D	7	1,900	0,100	1	0,500
E	7	1,875	0,125	1	0,725
F	7	1,850	0,150	1	0,750
G	7	1,800	0,200	1	1,000
H	7	1,750	0,250	1	1,250
I	7	1,700	0,300	1	1,500
J	7	1,600	0,400	1	2,000
K	7	1,500	0,500	1	2,500
L	7	1,400	0,600	1	3,000
M	7	1,300	0,700	1	3,500
N	7	1,200	0,800	1	4,000
O	7	1,100	0,900	1	4,500
T	7	2	0	1	0

La répartition du milieu, de l'antiseptique et des suspensions bactériennes a été effectuée selon la technique habituelle du Laboratoire, afin d'éviter les contaminations.

TABLEAU XII

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Aspect des cultures de *B. lactis niger* GORINI

1° Après 24 heures d'étuve à 37° C.

	type Ra	type Rb	type S
Témoin	Voile blanchâtre légèrement ponctué Trouble des 3/4 supérieurs du liquide (1).	Voile grisâtre remon- tant, légèrement plissé Trouble gra- nuleux des 2/3 (1).	Trouble homogène des 2/3 supérieurs du liquide (1). Pas de voile.
A	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Trouble de tout le tube.
B	Comme le témoin. Trouble très abondant	Comme le témoin.	Trouble homog. Pas de voile.
C	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.
D	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1).
E	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.
F	Pas de voile. Trouble de tout le tube. Flocons.	Voile léger. Trouble des 2/3 supér. (1).	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1).
G	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1).	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1). Pas de voile	<i>Liquide clair.</i>
H	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1).	Trouble des 2/3 supé- rieurs (1).	»
I	Trouble léger et pré- cipité.	Trouble de la moi- tié (1) supérieure en liquide.	»
J	Trouble et précipité.	<i>Liquide clair.</i>	»
K	Trouble léger.	»	»
L	<i>Liquide clair.</i>	»	»

(1) Il s'agit ici de la partie de la colonne liquide qui se trouve sous le voile.

2° Après 48 heures d'étuve à 37° C., dans ces conditions d'expérience je n'ai relevé, chez les types Rb et Ra qu'une différence: le trouble signalé pour les cultures avait envahi uniformément tous les tubes, mais ceux qui ne présentaient après 24 heures aucune végétation, étaient restés clairs.

Pour le type S au contraire, les tubes désignés par les lettres G, H, I, présentaient des signes très nets de végétation, qui se traduisaient par l'apparition d'un trouble homogène occupant les 2/3 supérieurs de la colonne liquide. La végétation s'arrêtait, comme pour le type Ra, au tube J (concentration 2 p. 1.000).

L'étude de la dose infertilisante de phénol pour les trois souches dissociées de *Bacillus lactis niger* GORINI nous montre que les chiffres obtenus sont très près les uns des autres, et il serait peut-être osé d'en tirer une conclusion, puisque ces chiffres sont:

Pour le type Ra, 3 p. 1.000;

Pour le type Rb, 2 p. 1.000;

Pour le type S, 2 p. 1.000.

Heureusement, l'étude de la dose mortelle nous apporte un élément de différenciation appréciable, comme nous allons pouvoir le constater.

DOSE MORTELLE DE PHÉNOL

Dans cette expérience les tubes précédents sont d'abord laissés à l'étuve à 37° C. durant une semaine. On réensemence alors sur eau peptonée à 2 % les tubes qui ne présentaient aucune végétation.

RÉSULTATS OBTENUS

Type Ra. — Après 24 heures d'étuve à 37° C. tous les tubes, y compris ceux qui renfermaient la concentration la plus forte, en phénol, présentaient un trouble homogène et des flocons abondants.

Type Rb. — Tous les tubes montraient un voile grimpant plissé, et un trouble du tiers supérieur du liquide nutritif.

Type S. — Tous les tubes présentaient un trouble uniforme.

Il était donc nécessaire d'élaborer un second protocole où les doses de phénol seraient supérieures.

Deuxième protocole

	Eau peptonée	Eau physiol.	Phénol à 5 %	Suspens.	Concentr. 0/00
	—	—	—	—	—
A	7 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	5
B	7	0,8	1,2	1	6
C	7	0,6	1,4	1	7
D	7	0,4	1,6	1	8
E	7	0,2	1,8	1	9
F	7	0	2	1	10
T	7	2	0	1	0

Aucun de ces tubes n'a montré, ni après 24 heures, ni par la suite, trace de végétation, excepté naturellement les témoins, qui ont montré :

Pour le type Ra. — Voile blanchâtre légèrement ponctué et trouble des 2/3 supérieurs du liquide.

Pour le type Rb. — Voile grisâtre remontant, plissé et trouble granuleux des 2/3 supérieurs du liquide.

Pour le type S. — Trouble homogène des 3/4 supérieurs du liquide.

J'ai donc réensemencé tous ces tubes sur milieu normal (eau peptonée à 2 %, de pH = 7,2), et j'ai obtenu les résultats suivants :

Forme dissociée Ra. — Tous les tubes montraient, après 24 heures, un trouble et des filaments abondants.

Forme dissociée Rb. — Tous les tubes ont montré un voile plissé et grimpant, et un trouble du premier centimètre du liquide sous le voile.

Forme dissociée S. — Tous les tubes ont présenté un trouble homogène.

La dose mortelle n'était donc pas encore atteinte. Comme il est pratiquement impossible de dissoudre plus de 5 grammes de phénol dans 100 cm³ d'eau, j'en ai été réduit, pour constituer un nouveau protocole, à faire varier les quantités du milieu nutritif.

Troisième protocole

	Eau peptonée	Eau physiol.	Phénol à 5 %	Suspens.	Concentr 0/00
	—	—	—	—	—
A	6 cm ³	0 cm ³	3 cm ³	1 cm ³	15
B	5	0	4	1	20
C	4	0	5	1	25
D	3	0	6	1	30
T	7	0	0	1	0

Après 24 heures, les tubes témoins montraient l'aspect suivant :

Type Ra. — Voile blanchâtre peu résistant et trouble des 3/4 supérieurs du liquide sous le voile.

Type Rb. — Voile remontant plissé et trouble des 2/3 supérieurs du liquide sous le voile.

Type S. — Trouble homogène.

Les autres tubes ne présentaient aucune végétation. Réensemencés sur eau peptonée à 2 %, ils m'ont permis de constater que :

Les types Ra et S sont tués par 15 p. 1.000 de phénol, alors que Rb subit sans dommage des concentrations de 15 et 20 p. 1.000, et même de 50 p. 1.000. Ce même type, après passage sur un milieu nutritif fortement phéniqué, et réensemencement sur milieu normal voit ses caractères rugueux exaltés par l'antiseptique.

La dose mortelle de phénol nous permet donc de constater une fois de plus la présence de deux groupes : d'une part, forme Rb, et d'autre part, formes Ra et S.

— :: —

CHAPITRE VIII

Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des trois types de *B. lactis niger* GORINI cultivés en milieu synthétique.

Il est impossible de faire dans les lignes qui vont suivre une revue de la littérature établissant une relation entre la tension superficielle et la division cellulaire. D'ailleurs, en 1907, H. VINCENT, en 1912, MACALLUM (qui a fait une excellente mise au point de cette question), en 1918, AVERY, en 1923, HAYEN, RUPP et JOHNSON, en 1930, BOAS, NEUMULLER, en 1931, KOPACZEWSKY, enfin, en 1932, LASSEUR, VERNIER, A. DUPAIX et L. GEORGES ont, à différents moments, résumé nos connaissances sur la tension superficielle.

Les résultats expérimentaux obtenus au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Nancy nous intéressent particulièrement puisqu'ils ont trait, non seulement à des Bacéttries chromogènes, mais encore à des germes sporogènes. Il est à remarquer que les Bactéries du groupe *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, sont particulièrement sensibles à l'action du glycocholate et du tauracholate de sodium.

Dans les milieux L_1 et L_2 additionnés de quantités de glycocholate variant de 0,25 à 1 %, les types dissociés n'ont jamais pu se développer quels que soient le temps d'observation et la température utilisée. Etant donnée l'absence de développement dans les milieux additionnés de substances tensio-actives, je me bornerai à mettre en parallèle le développement des types dissociés dans les milieux L_1 et L_2 non additionnés de glycocholate de sodium.

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, je vais indiquer la technique utilisée.

Technique utilisée

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS

Les cultures ont été obtenues par ensemencement des trois types dissociés sur gélose inclinée de $\text{pH} = 7,2$ et séjour à l'étuve à 37°C . pendant 24 heures. Les suspensions qui comprenaient 4.000.000.000 de germes au cm^3 ont été effectuées aseptiquement dans l'eau physiologique

Pour chaque type dissocié :

d'une part :

- 4 tubes de milieu L_1 , non additionné de glycocholate ;
- 4 — L_1 , additionné de 0,25 % de glycocholate ;
- 4 — L_1 , additionné de 1 % de glycocholate ;

d'autre part :

- 4 tubes de milieu L_2 , non additionné de glycocholate ;
- 4 — L_2 , additionné de 0,25 % de glycocholate ;
- 4 — L_2 , additionné de 1 % de glycocholate.

reçoivent aseptiquement $1/10$ de cm^3 de suspension bactérienne.

Les tubes sont alors mis à l'étuve à 37°C .

Les germes n'ayant présenté aucune végétation sur les milieux additionnés de glycocholate, je me limiterai à signaler l'aspect des cultures sur les milieux L_1 et L_2 n'ayant subi aucun apport de substance tensio-active.

TABEAU XIII

MILIEU L₁

	Ra	Rb	S
Après 2 jours	Fin liseré. Pas de pellicule. Léger tr. Flocons incolores.	Voile blanc grim pant. Louche léger sous le voile (8-10 mm.). Incolore. Sur 2 tubes liquide clair.	Développement assez faible Fin liseré. Léger trouble uniforme.
Après 4 jours	Liseré import. (2-3 millimètres). Pellicule. Trouble sur le 1/2 cm. supér. Flocons incolores.	Voile blanc grim pant granuleux sur 1/2 cm. et plus. Trouble du cm. supér. Liquide sous-jacent clair.	Liseré. Fine pellicule. Trouble du dernier cm. dû à des traînées blanchâtres tombant de la pellicule. Trouble unif. léger du reste du liquide et flocons.
Après 6 jours	Comme après 4 jours	Voile grim pant sur 1 cm. boursoufflé. Liquide clair.	Comme après 4 jours, mais trouble uniforme.
Après 8 jours	Trouble homogène Pellicule. Liseré sur 8-10 mm.	Voile grim pant sur 1,2 à 1,4 cm. brunâtre, boursoufflé. Liquide clair. Trouble léger dans un tube.	Pellicule assez imp. mais sans consistance. Liseré sur 1/2 cm. Trouble homogène.
Après 10 jours	Comme après 8 jours.	Comme après 8 jours	Comme après 8 jours

TABEAU

TABLEAU XIV

MILIEU L₂

	Ra	Rb	S
	—	—	—
Après 2 jours	Pellicule. Trouble incolore un peu plus dense à la partie supérieure.	Voile blanc grim pant. Trouble des 2/3 supérieurs de la colonne liquide sous-jacente.	Pas de pellicule. Léger liseré. Trouble presque uniforme pour 3 tubes. Plus dense en haut pour le 4°. Incolore.
Après 4 jours	Pellicule granuleuse. Liseré blanchâtre. Trouble homogène.	Voile blanc grim pant. Trouble imp. du 1/3 sup. de la colonne liquide sous-jacente.	Mêmes caractères que L ₁ mais plus accentués pour le trouble et la pellicule.
Après 6 jours	Même aspect que pour 4 jours.	Voile blanc grim pant. moins imp. qu'en L ₁ . Trouble sous le voile.	Même aspect qu'après 4 jours.
Après 8 jours	Trouble plus import. qu'en L ₁ . Liseré sur 1/2 cm.	Voile blanc grim pant (1/2 cm.). Trouble sous le voile (1 cm. environ).	Pellicule assez épaisse (1-1,5 mm.). Trouble homogène du liquide.
Après 10 jours	Comme après 8 jours.	Comme après 8 jours.	Comme après 8 jours.

Les différences d'aspect des cultures sur milieux L_1 et L_2 (1) suffiraient donc à justifier l'intérêt de cette étude. Elles ne nous permettent pas néanmoins de séparer, comme l'ont fait les expériences précédentes, les trois types dissociés en deux groupes bien distincts.

**Cultures de *Bacillus lactis niger* GORINI
sur gélose additionnée de quantités croissantes
de taurocholate de sodium**

Le milieu de RAULIN a été utilisé depuis longtemps pour la culture des Champignons, mais il faut reconnaître que c'est depuis les belles recherches de SAUTON que les milieux chimiquement définis ont pu être utilisés pour le développement des Bactéries pathogènes. Sous ces réserves constatons que certaines Bactéries (2) se développent mieux dans les milieux naturels. C'est ce qui nous explique pourquoi l'addition de substances tensio-actives n'a pas permis le développement de *Bacillus lactis niger* GORINI en milieu L_1 et L_2 (3).

(1) Milieu synthétique L_1 de LASSEUR:

Asparagine: 0 gr. 900;
Glycérine: 2 gr. 500;
Phosphate bipotassique: 0 gr. 250;
 SO^4Mg : 0 gr. 500;
 $CaCl^2$: 0 gr. 040;
 SO^4Fe : 0 gr. 010;

N

NaOH —: 8 cm³;

10

H^2O bidistillée ($K = 1 \times 10^{-6}$): Q.S. 100 cm³.

Milieu synthétique L_2 de LASSEUR:

Asparagine: 0 gr. 900;
Succinate d' NH^4 : 0 gr. 100;
Glycérine: 2 gr.;
Glucose: 1 gr.;
Phosphate bipotassique: 0 gr. 250;
 SO^4Mg : 0 gr. 500;
 $CaCl^2$: 0 gr. 040;
 SO^4Fe : 0 gr. 010;

N

NaOH —: 8 cm³;

10

H^2O bidistillée ($K = 1 \times 10^{-6}$): Q.S. 100 cm³.

(2) Et en particulier les germes récemment isolés.

(3) Bien que ces germes puissent se développer sur milieu L_1 et L_2 en l'absence de substances abaissant la tension superficielle.

Il n'est pas rare, sur gélose taurocholâtée, de noter un retard dans l'apparition des colonies. C'est là un fait d'ordre général. Le pouvoir abiotique est fonction, non seulement de l'espèce bactérienne, de la température, etc... mais encore du milieu sur lequel est réalisé le contact *microbe-substance microbicide*.

La multiplicité des facteurs d'action constitue autant de causes d'erreur et ainsi s'expliquent de nombreuses contradictions observées dans la littérature relative aux antiséptiques.

Ceci posé, je vais indiquer le résultat des recherches que j'ai effectuées sur l'influence du taurocholate de sodium sur la végétation des trois types dissociés en milieu solide.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1° MODE OPÉRATOIRE SUIVI

Comme dans les recherches précédentes, les cultures ont été obtenues sur gélose inclinée après séjour à l'étuve à 37° C. J'ai alors effectué trois suspensions de même opacité (4.000.000.000 de germes au cm³ environ) en eau physiologique, à l'aide du fil de platine préalablement stérilisé à la flamme du bec Bunsen. Pour chacune de ces suspensions, j'ai alors opéré 4 dilutions, selon le protocole ci-dessous :

- A — 6 cm³ d'eau physiologique renfermant 4 milliards de plastides au centimètre cube ;
- B — 6 cm³ — + 4 gouttes de A ;
- C — 6 cm³ — + 4 gouttes de B ;
- D — 6 cm³ — + 4 gouttes de C ;
- E — 6 cm³ — + 4 gouttes de D.

D'autre part, j'ai utilisé 12 boîtes de Pétri stérilisées au four Pasteur, et dont le couvercle était muni d'un disque de papier-filtre destiné à retenir l'eau de condensation de la gélose qui joue un rôle important dans la végétation microbienne, comme l'ont démontré des expériences faites au Laboratoire par LASSEUR et ses Collaborateurs (1930-1937).

Le schéma ci-dessous montre comment fut effectué pour chaque type

l'ensemencement des boîtes de gélose témoins (gélose ordinaire de pH = 7,2), des boîtes de gélose taurocholatée à 0,25 % et des boîtes de gélose taurocholatée à 1 %.

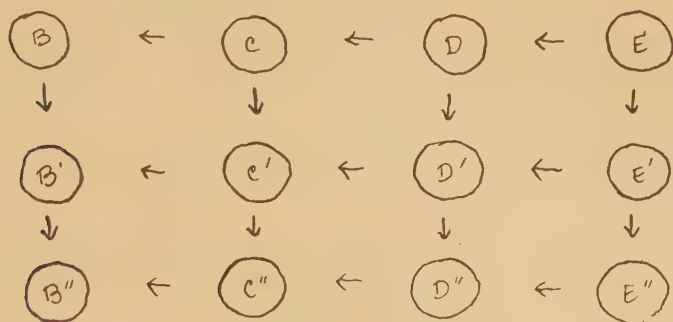


Fig. 7

Chaque boîte a reçu 2 gouttes de la dilution correspondante, étant bien entendu que l'ensemencement a commencé par la plus forte dilution. Le milieu approprié a été alors coulé dans chaque boîte de Pétri, et, après refroidissement suffisant de la gélose, j'ai, par un mouvement d'inclinaison de la boîte, effectué une répartition aussi égale que possible de la suspension bactérienne dans le milieu nutritif.

2° RÉSULTATS OBTENUS

Dans l'expression des résultats je n'ai considéré pour chaque type qu'une dilution: celle qui se rapprochait le plus par le nombre des colonies de la boîte témoin, du nombre 500, afin d'avoir des résultats comparables.

Expérience n° 1. — *B. lactis niger* GORINI type Rb, la dilution la plus favorable présente:

TABLEAU XV

	Après 24 heures	Après 48 heures
Gélose témoin	502 colonies	526 colonies
Gélose taurocholatée à 0,25 %	0	262
Gélose taurocholatée à 1 %	0	157

Expérience n° 2. — *B. lactis niger* GORINI type Ra, la dilution la plus favorable présente :

	Après 24 heures	Après 48 heures
Gélose témoin	605 colonies	623 colonies
Gélose taurocholatée à 0,25 %	526	541
Gélose taurocholatée à 1 %	0	262

Expérience n° 3. — *B. lactis niger* GORINI type S, la dilution la plus favorable présente :

	Après 24 heures	Après 48 heures
Gélosé témoin	475 colonies	480 colonies
Gélose taurocholatée à 0,25 %	337	345
Gélose taurocholatée à 1 %	282	310

REMARQUES

B. lactis niger GORINI type Ra, montre un pigment noir après 48 heures sur la gélose témoin seule.

Chez *B. lactis niger* GORINI type Ra, après 24 heures d'étuve, la gélose témoin et la gélose taurocholatée à 0,25 % présentent des colonies, alors que, dans le même temps, seul le témoin en présente chez Rb.

Avec *B. lactis niger* GORINI type S, seul les trois séries de boîtes de Pétri présentent, après 24 heures, des colonies. Après 48 heures le pigment noir est apparu sur gélose témoin et sur gélose taurocholatée à 0,25 %. Le taurocholate à 1 % gêne son apparition.

REMARQUE GÉNÉRALE

En plus du retard constaté dans le nombre des colonies poussées sur taurocholate et dans l'apparition du pigment, j'ai noté une différence considérable dans la taille des colonies. En effet, les colonies témoins sont bien plus grandes que celles qui ont poussé sur gélose taurocholatée.

Des expériences ci-dessus, il ressort que le type S semble être le moins sensible à la substance tensio-active. Le type sporulé est très influencé, comme il résulte de l'examen du tableau suivant, où les nombres obtenus

sont tous ramenés à 1.000 pour les témoins et aux nombres proportionnels à 1.000 pour les géloses taurocholâtées.

TABLEAU XVI

	Après 24 heures			Après 48 heures		
	— Ra	— Rb	— S	Ra —	Rb —	S —
Gélose témoin	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Gélose taurocholâtée à 0,25 %	869	0	712	868	498	718
Gélose taurocholâtée à 1 %	0	0	617	420	298	645

On peut, avec les substances tensio-actives, retrouver les deux groupes Ra-S et Rb, de façon peut-être un peu moins nette que dans l'étude de certains autres caractères, mais néanmoins suffisante pour qu'elle mérite d'être signalée.

— : —

CHAPITRE IX

Potentiel d'oxydo-réduction des trois types dissociés

Pour mettre en évidence la fermentation des glucides, les Bactériologistes sont, depuis de nombreuses années, habitués à cultiver les organismes sur les milieux additionnés d'indicateurs. Dans certains cas, le virage est très net. En aucune façon, le coefficient personnel n'intervient dans la lecture. Mais, dans certains cas, le changement de coloration s'accompagne d'un affaiblissement de la coloration dans le milieu. On s'est bientôt aperçu que certains colorants sont beaucoup plus faciles à décolorer que d'autres colorants. C'est ainsi qu'un milieu à pouvoir réducteur peu sensible est additionné de bleu de méthylène pur (1). Ce milieu estensemencé avec un germe tel que le *Staphylococcus aureus*. Dans ces conditions, nous assistons à une décoloration du milieu. Mais, dans mes essais, j'ai dû faire les lectures après des temps déterminés.

La décoloration est fonction du pH; mais le pH varie avec l'âge, d'où

(1) Exempt de Cl^2Zn . — Ce qui constitue somme toute la méthode au bleu de méthylène de THUNBERG QUASTEL, BACH et Mlle J. LAMBERT, auxquels la science est redevable de belles découvertes sur les déshydrogénases, ont adopté la technique suivante:

« Dans une série de tubes à essai en pyrex, on mesure, dans l'ordre les réactifs suivants: bleu de méthylène au 1/20.000: 0,5 cm³; solution tampon de phosphate N/20 de pH=7,2: 1 cm³; solution de donateur N/20: 0,5 cm³; Emulsion bactérienne titrée: 0,5 cm³; huile de vaseline: 8 gouttes.

« On soumet les tubes à l'action du vide pendant 3 minutes, à la température ordinaire, sous 10 à 15 mm. de mercure, puis on les remplit d'azote. Ensuite, au fur et à mesure que les tubes sont détachés de la rampe à vide, on y coule quelques centimètres cubes de vaseline liquéfiée. On transporte les tubes au thermostat à eau, à 40°, et on suit la décoloration du bleu de méthylène. » (BACH et LAMBERT, 1937-1938).

Le lecteur trouvera deux études particulièrement approfondies sur les déshydrogénases du Staphylocoque dans les bulletins n° 15 et 16 de l'Association des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

la nécessité de faire des lectures à temps fixe. De tous les caractères étudiés, celui-ci m'a donné les résultats les moins constants.

Résultats expérimentaux

A) TECHNIQUE EMPLOYÉE

1° OBTENTION DES SUSPENSIONS

Comme pour les autres expériences, les cultures ont été obtenues sur gélose inclinée de pH = 7,2, après séjour de 16 heures à l'étuve à 37° C. Les suspensions ont été effectuées dans l'eau physiologique et comprenaient 4.000.000.000 environ de germes au cm³.

2° MILIEU NUTRITIF EMPLOYÉ

J'ai utilisé des eaux peptonées de pH = 5,51, 6,45, 7,10 et 8,09. J'ai choisi intentionnellement ces pH parce que nous avons vu qu'ils permettent la vie des trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI.

3° SOLUTION DE COLORANT

J'ai effectué une solution de bleu de méthylène Microcolor à 0,1 % dans l'eau bi-distillée (1). J'ai obtenu trois teintes de bleu en ajoutant :

0,25 cm³ de solution de bleu à 0,1 % à la première série de tubes ;

0,50 cm³ de solution de bleu à 0,1 % à la deuxième série ;

1 cm³ de solution de bleu à 0,1 % à la troisième série.

4° TÉMOINS

J'ai utilisé comme témoins des tubes d'eau peptonée de pH identiques, auxquels j'ai ajouté les mêmes quantités de colorant, mais que je n'ai pasensemencés.

J'ai donc obtenu en fin de compte 3 séries de tubesensemencés, chaque série ayant une concentration différente en colorant.

Chacune de ces séries comportait 4 pH, et chacun des trois types dissociés étaitensemencé à ces 4 pH.

(1) La solution de bleu de méthylène a été stérilisée 3/4 d'heure à 120°.

Chacune des séries comportant en outre 4 témoins qui étaient constitués par 4 tubes d'eau peptonée de pH = 5,51, 6,45, 7,10 et 8,09, additionnés de la quantité de colorant qui caractérisait la série.

L'ensemencement des tubes a été effectué à raison de 1/10 de cm³ de suspension bactérienne (1). Les échelles de tubes ont été mises à l'étuve à 37° C.

B) ASPECT DES CULTURES

APRÈS 16 HEURES

Les séries ayant reçu 0,50 cm³ et 1 cm³ de bleu de méthylène à 0,1 % n'ont présenté aucune végétation. Par contre, la série ayant reçu 0,25 cm³ a montré :

TABLEAU XVII

	Ra	Rb	S
	—	—	—
pH = 5,51	Teinte très légèrement plus claire que le témoin.	Comme le témoin.	Teinte bien plus claire que le témoin (du simple au double environ).
pH = 6,45	Différence presque imperceptible avec le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.
pH = 7,10	Différence extrêmement légère avec le témoin.	Comme le témoin.	Teinte plus claire que le témoin (du simple au double environ).
pH = 8,09	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.

APRÈS 40 HEURES

Les séries ayant reçu 0,50 et 1 cm³ de colorant ne présentent toujours aucune trace de végétation. Ce caractère restera d'ailleurs immuable et je ne le comprendrai plus dans l'exposé des résultats.

(1) Comprenant 2.000.000.000 de germes au centimètre cube.

TABLEAU XVIII

Avec la série à 0,25 cm³, j'ai relevé les observations :

	Ra	Rb	S
pH = 5,51	Teinte plus claire que le témoin (du simple au double).	Teinte plus claire que le témoin (du simple au double).	Beaucoup plus claire que le témoin (valeur relative 1/4).
pH = 6,45	Teinte plus claire que le témoin (du simple au double).	Vert très clair (1/6 à 1/7 environ) de la teinte du témoin.	Teinte plus claire (du simple au double).
pH = 7,10	Légèrement plus claire que le témoin.	Comme le témoin.	Vert très clair (1/6 environ) de la teinte du témoin.
pH = 8,09	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.

APRÈS 5 JOURS

La série ayant reçu 0,25 cm³ de bleu de méthylène par tube, nous montre :

TABLEAU XIX

	Ra	Rb	S
pH = 5,51	Teinte bleue beaucoup plus claire que le témoin (val. relative 1/4-1/5).	Vert clair (val. relat. 1/6-1/7).	Bleu très clair (val. rel. 1/4-1/5).
pH = 6,45	Vert clair (1/8 env.).	Vert clair (1/8 env.).	Vert clair (1/8).
pH = 7,10	Vert très clair (1/8).	Comme le témoin.	Vert extrêmement clair, presque jaune.
pH = 8,09	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.

APRÈS 20 JOURS

La série à 0,25 présente les aspects suivants :

TABLEAU XX

	Ra	Rb	S
	—	—	—
pH = 5,51	Jaune verdâtre. Pellicule.	Vert assez foncé. Pellicule.	Vert très clair.
pH = 6,45	Jaune vert très clair.	Vert foncé. Voile remontant sur 2-3 millimètres.	Jaune vert très clair.
pH = 7,10	Jaune verdâtre.	Comme le témoin.	Jaune vert très clair.
pH = 8,09	Comme le témoin.	Comme le témoin.	Comme le témoin.

De ces observations, il résulte que :

1° L'addition de 0,5 et 1 cm³ de bleu de méthylène dans chaque tube empêche la végétation des trois types dissociés de *Bacillus lactis niger* GORINI.

2° L'addition de 0,25 cm³ de bleu de méthylène à pH = 8,09 empêche toute végétation.

3° A pH = 7,10, l'addition de 0,25 cm³ de bleu de méthylène empêche la végétation du type Rb de *Bacillus lactis niger* GORINI, et ce caractère se maintient quel que soit le temps d'observation.

Ce caractère me semble suffisant pour affirmer que le type Rb est différenciable par le bleu de méthylène du groupe des deux types Ra - S.

4° L'apport du bleu de méthylène semble supprimer le voile chez le type S. Le voile réapparaît néanmoins chez Rb, après 20 jours, mais sous forme de plaques qui finissent par se réunir.

5° Le leuco dérivé formé est réoxydé à la surface des cultures par l'oxygène atmosphérique, car le fond des tubes est toujours plus clair que le premier centimètre de liquide.

6° Le bleu de méthylène modifie la morphologie des Bactéries, comme nous allons le constater.

MODIFICATIONS DE LA MORPHOLOGIE DES PLASTIDES AYANT SUBI L'ACTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE

Examinées entre lame et lamelle, les plastides ont montré les modifications suivantes :

Type Ra. — Plastides très grandes et très larges renfermant des grains colorés en bleu (2 fois la largeur normale environ). Les grains sont visibles parfois à une extrémité ou aux deux extrémités seulement. Signalons en outre, la présence extrêmement fréquente d'éléments en filaments semblant rattachés les uns aux autres par des plasmodèmes. Certains de ces filaments sont assez longs pour occuper la moitié du champ microscopique. Certaines plastides sont beaucoup plus colorées que d'autres ; il s'agit vraisemblablement de plastides mortes.

Type Rb. — Nombreuses spores. Certaines plastides présentent des grains colorés polaires.

Type S. — Présence de diplobacilles et de germes isolés montrant les mêmes modifications morphologiques que Ra.

REMARQUE GÉNÉRALE

Il semble qu'il y ait eu, pour les trois germes, une certaine agglutination.

————— ∴ —————

CHAPITRE X

Conductibilité des suspensions bactériennes

L'importance de la conductibilité spécifique de l'eau en Microbiologie a été étudiée par de nombreux auteurs. Mais c'est surtout vers 1913 que LASSEUR sous la direction de son maître M. le Professeur P.-Th. MULLER et de son excellent camarade ROMANN a déterminé la conductibilité des eaux servant à la préparation des milieux de culture pour les Bactéries chromogènes.

A Nancy, MM. les Professeurs ROTHÉ et ROMANN et M. le Professeur GIRARDET ont dans des directions diverses tenté d'obtenir des eaux de plus en plus pauvres en électrolytes. Cette question a été reprise par LASSEUR, GIRARDET et VERMELIN en 1924-1925, LASSEUR et ses Collaborateurs en 1932-1933. Les auteurs se sont efforcés d'augmenter la précision des mesures et nous représentons schématiquement leurs installations successives dans la page 99 (1).

MODIFICATIONS AU SCHÉMA 3

SCHÉMA 4:

L'installation représentée par le schéma 3 présentait encore de graves inconvénients. Tout d'abord le contact entre l'aiguille et le fil de platine dans le pont de Wheatstone n'était pas satisfaisant et c'est pour cela que nous avons demandé à la maison Chaix de nous fournir un pont (2) dont le fil d'une longueur de 2 mètres (divisé en 1.000 parties) est enroulé sur un tambour.

(1) Cette question sera d'ailleurs étudiée par LASSEUR et ses Collaborateurs dans le Fascicule n° XI des Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

(2) Nous n'avons utilisé qu'une partie de cet appareil (fil et curseur).

Le contact entre le fil et le curseur est meilleur que dans l'installation 3 où une poussière pouvait à elle seule rendre le contact défectueux (1).

SOURCE ALTERNATIVE

La bobine de Ruhmkorff (*inductorium* de KÖHLER) (1924-1932) était bien le moins mauvais des appareils de ce genre, mais il laissait toujours un bruit de fond, lorsqu'on utilisait soit le haut-parleur, soit le téléphone. Or ce bruit rendait les mesures très pénibles lorsque les résistances étaient de l'ordre de 20.000 à 50.000 ohms et c'est pour cela que LASSEUR et ses Collaborateurs (1933) utilisèrent l'hétérodyne H^1 .

Puis, grâce au concours de M. JOUAVILLE, nous avons pu remplacer le générateur à fréquence musicale du schéma 3 (H^1) par une hétérodyne H^2 à fréquence musicale (1.000 périodes environ).

Dans cette installation, l'emploi des piles et accumulateurs est complètement évité et l'appareil est alimenté par le secteur. La Faculté de Pharmacie ne possédant pas de courant alternatif, nous avons utilisé une commutatrice. Cette alimentation sur le secteur qui a été particulièrement bien étudiée par M. JOUAVILLE a permis de supprimer toutes les piles et accumulateurs. L'appareil peut être branché sur tout secteur à 50 périodes (110-250 volts).

Le redressement de la haute tension est obtenu à partir d'une valve 5Y3; la lampe oscillatrice est une 6F6 métallique ou bien encore une 6G6G à ampoule verre et culot américain octal. L'appareil se présente sous la forme d'un petit châssis métallique porté par quatre pieds en caoutchouc (figure 2, page 99).

Dans le schéma 4, l'appareil de Zéro est constitué par un voltmètre amplificateur alimenté directement sur courant alternatif 50 périodes (110-250 volts).

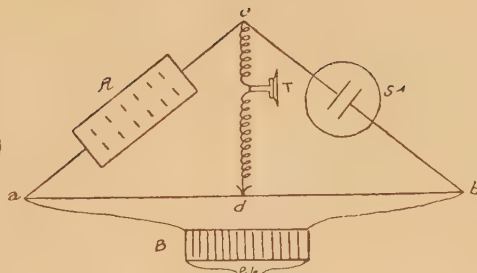
On effectue la lecture à l'aide de l'œil cathodique et à l'aide du milliampèremètre, l'œil cathodique ne donnant qu'une première approximation. Pour augmenter la précision de nos lectures, nous utilisons un second milliampèremètre (2). La figure 3, Pl. 000 représente le voltmètre amplificateur.

(1) Dans l'appareil de Chaix on n'a pas à redouter les contacts défectueux de l'installation 3 car le constructeur nancéen a eu soin d'utiliser non pas un point de contact mais quatre couteaux décalés.

(2) La zone de silence aurait pu être déterminée avec plus de précision si l'aiguille du curseur avait été plus fine dans les schémas 1, 2 et 3.

Schéma 1

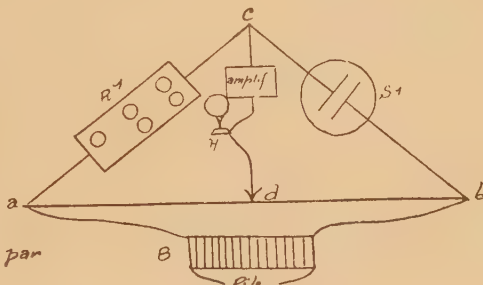
R : résistances (fils)
 T : téléphone
 S^1 : thermostat (régulateur)
 au xylol
 B : bobine.



Appareil utilisé en 1924
 par Lasseur et Girardet
 en 1925 par Lasseur, Girardet et Vermelin
 en 1928 par Lasseur et Mobilat

Schéma 2

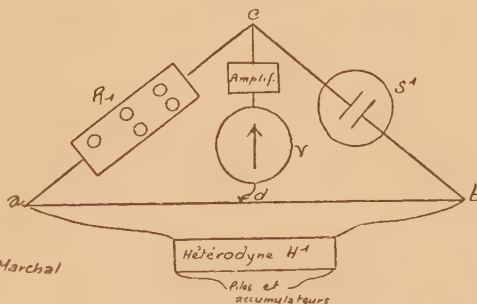
R^1 : résistances (décades)
 amplif : amplificateur
 H : Haut parleur
 S^1 : thermostat (régulateur)
 au xylol
 B : bobine de Ruhmkorff
 - inductorium de Köhler



Appareil utilisé en 1932 par
 Lasseur et A. Dupaix

Schéma 3

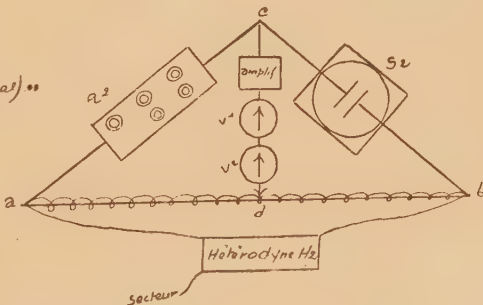
R^1 : résistances (décades)
 amplif : amplificateur
 V : Voltmètre
 S^1 : thermostat (régulateur)
 au xylol



Appareil utilisé en
 1933 par Lasseur
 Jouaume, A. Dupaix et J.B. Marchal

Schéma 4

R^2 : résistances (décades
 contact dual)
 S^2 : thermostat électrique
 amplif : amplificateur
 V^1, V^2 : voltmètres
 ab : fil de platine.



(Schéma 4). La boîte de résistances à décades à contacts duals a été construite par Tinsley. La somme des résistances est de 111.110 ohms.

Le schéma 4 représente la dernière installation utilisée au Laboratoire de M. LASSEUR.

Toutes les mesures ont été effectuées après séjour des suspensions au thermostat électrique à 25° C. Les électrodes employées sont celles d'ARRHÉNIUS.

MATÉRIEL BACTÉRIEN

Les germes ont été cultivés sur gélose en boîte de ROUX à l'étuve à 37° C., puis lavés trois fois à l'eau bi-distillée.

Après centrifugation, les corps microbiens sont remis en suspension dans l'eau bi-distillée. Dans les essais préliminaires, les suspensions renfermaient 4.000.000.000 de plastides au cm³. Nous avons obtenu des valeurs trop petites (ex.: $K = 132 \times 10^{-6}$). Avec de tels nombres on ne pouvait que difficilement espérer observer des variations notables chez les trois types dissociés.

C'est la raison pour laquelle les différentes mesures effectuées sur *B. lactis niger* GORINI, comme d'ailleurs, sur *B. caryocaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, et sur *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER-BAILLY ont été réalisées sur des suspensions renfermant 15.000.000.000 de germes au cm³.

ÉTUDE DE LA CONDUCTIBILITÉ

DES SUSPENSIONS DE *Bacillus lactis niger* GORINI

TABEAU XXI

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous (1):

Temps de contact	Type Ra	Type Rb	Type S
T. 0	650	368	587
T. 15'	718	392	618
T. 30'	724	410	636
T. 45'	729	410	641
T. 60'	739	412	655

(1) Les mesures de conductibilité ont été déterminées après des temps variant de 0 à 60 minutes (temps de contact entre corps bactériens et liquide dispersif). Les mesures ont été faites non pas sur le même échantillon mais sur des parties aliquotes d'une même suspension.

Il est à remarquer tout d'abord que la conductibilité est plus faible pour les suspensions du type Rb que pour les suspensions des autres types. La diffusion des électrolytes dans le liquide dispersif est rapide. C'est ce qui ressort de l'examen des valeurs obtenues avec *B. lactis niger* GORINI Rb, après les différents temps de séjour au thermostat.

Avec les types Ra et S, on observe des valeurs supérieures à celles déterminées pour Rb. Il semble que de 30 à 45 minutes, la diffusion des électrolytes soit très faible. Chez ces deux types, la courbe de diffusion des électrolytes semble nettement différente de celle qui serait obtenue pour Rb, et se ramènerait à une courbe en forme de S (1).

La conductibilité comme les autres caractères étudiés, permet de ramener les trois types dissociés à deux groupes: Rb et Ra-S.

(1) Il est un autre moyen de se rendre compte de la variation de la perméabilité de la membrane, c'est l'addition à la suspension d'une quantité donnée d'un électrolyte et plus particulièrement d'un corps coloré. Nous avons déjà effectué des recherches dans ce sens, mais nous pensons qu'avant de les résumer, il est nécessaire d'effectuer de nouvelles expériences.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En résumé, la dissociation, si nettement mise en évidence par les auteurs américains, italiens et français, ne constitue pas une vue de l'esprit, mais bien une réalité.

On pouvait se demander s'il ne serait pas possible de classer les types dissociés dans un certain ordre à l'aide de caractères convenablement choisis.

Ce choix varie évidemment avec la discipline dont on est imprégné. Un chimiste fera appel aux transformations des milieux de culture; un botaniste à la forme des plastides, à la sporulation, à la germination; un médecin, un vétérinaire, au pouvoir pathogène; enfin celui qui s'intéresse plus particulièrement aux fermentations, cherchera surtout par les produits de la vie microbienne en aérobiose ou en anaérobiose à caractériser les types dissociés. Dans mes recherches, parfois divergentes, mais répétées, je n'ai peut-être pas réalisé la « *bonne expérience* », mais j'ai multiplié les essais afin que les causes d'erreur puissent se compenser. Dans ces conditions d'expérimentation, je suis arrivé à trois classifications:

1° Ra et Rb-S, à l'aide de: { la protéolyse de la gélatine;
l'étude des dimensions;
la vitesse de décoloration dans la méthode
de GRAM.

2° Rb et Ra-S, à l'aide de: { la sporulation;
l'action du taurocholate de Na;
la conductibilité;
l'action des antiseptiques;
la modification du pH;
le potentiel d'oxydo-réduction.

3° Seule, l'action sur le lait semble permettre la séparation nette du type S des types Ra et Rb.

PLANCHES

PLANCHE I

B. lactis niger GORINI type Rb_3 et type S (1)

Fig. 1. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_3 . (Gross.: 1×21 .)

Fig. 2. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI S. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 3. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_3 . (Gross.: 1×21 .)

Fig. 4. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI S, âgée de 3 jours. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 5. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI S, âgée de 48 heures. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 6. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI, âgée de 3 jours. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 7. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI S. (Gross.: 1×21 .)

(1) Pour l'étude de la dissociation de *B. lactis niger* GORINI, *B. megatherium* souche CALMETTE, *B. subtilis* souche MICHIGAN et souche MARBURG, nous avons utilisé la température de 37° C, tandis que les Bactéries chromogènes ont été cultivées à la température du laboratoire.

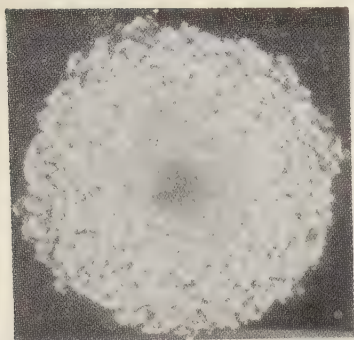


Fig. 1

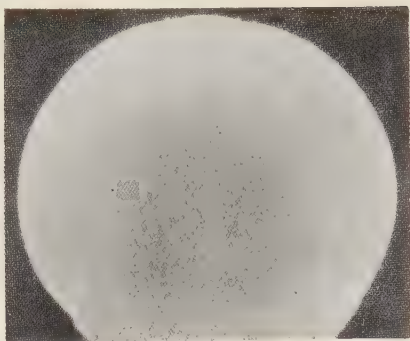


Fig. 2

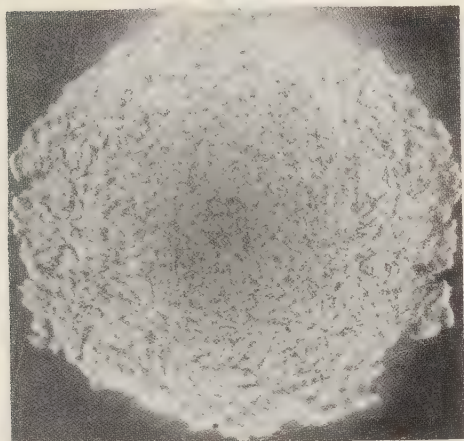


Fig. 3

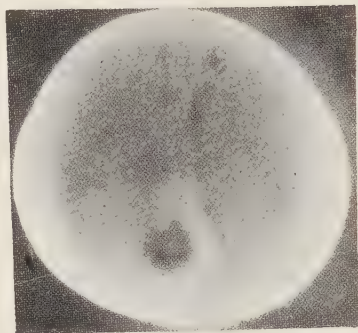


Fig. 4

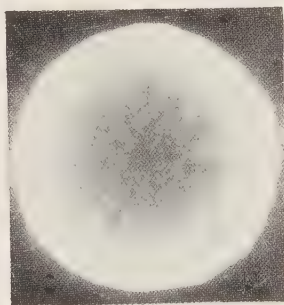


Fig. 5



Fig. 6

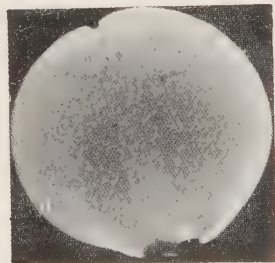


Fig. 7

PLANCHE II

B. lactis niger GORINI type Rb_1

- Fig. 1. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 , âgée de 3 jours. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 2. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 , âgée de 3 jours. (Gross.: 1 × 59.)
- Fig. 3. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 . (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 4. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 , âgée de 3 jours. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 5. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 , âgée de 13 jours. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 7. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 . (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 8. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Rb_1 . (Gross.: 1 × 86.)
-

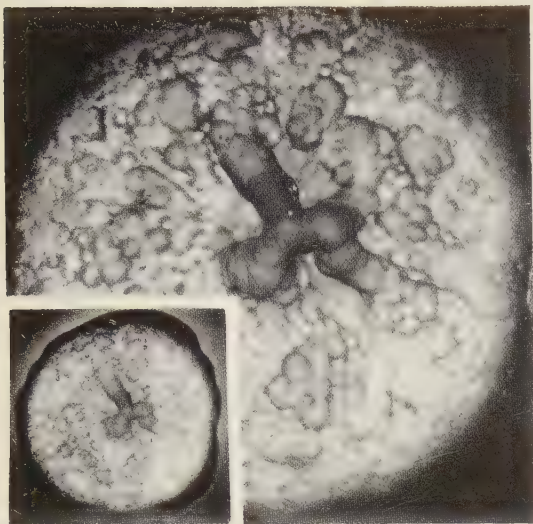


Fig 1

Fig. 2

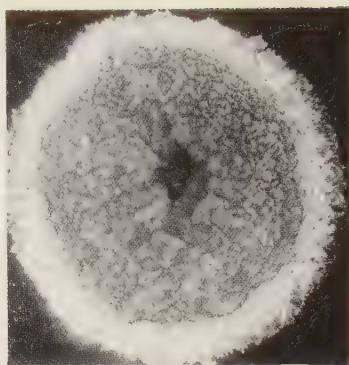


Fig. 3

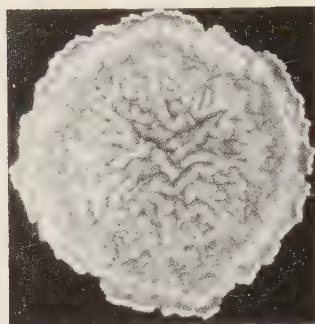


Fig 4

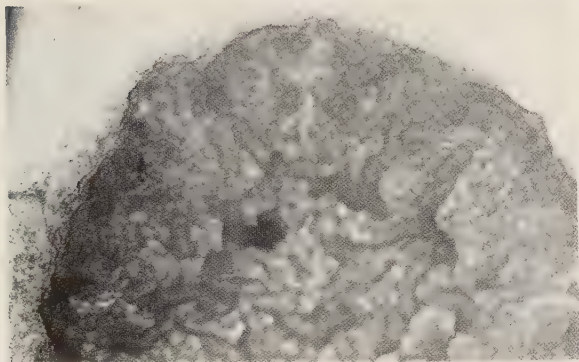


Fig 5

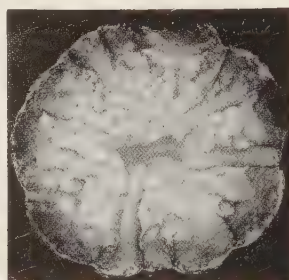


Fig. 6

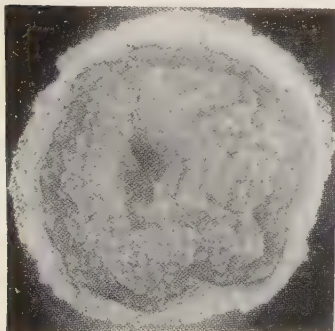


Fig. 7

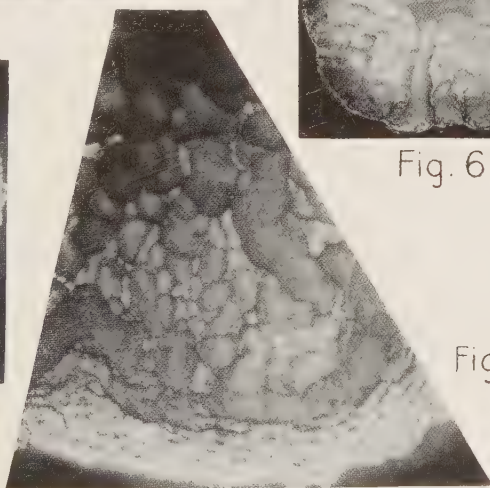


Fig 8

PLANCHE III

B. lactis niger GORINI, type Ra

Fig. 1. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra. (Gross.: 1 × 21.)

Fig. 2. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra. (Gross.: 1 × 59.)

Fig. 3. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra, âgée de 4 jours. (Gross.: 1 × 21.)

Fig. 4. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra. (Gross.: 1 × 21.)

Fig. 5. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra, âgée de 4 jours. (Gross.: 1 × 21.)

Fig. 6. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra, âgée de 1 jours. (Gross.: 1 × 59.)

Fig. 7. — Colonie de *B. lactis niger* GORINI Ra. (Gross.: 1 × 21.)



Fig. 1

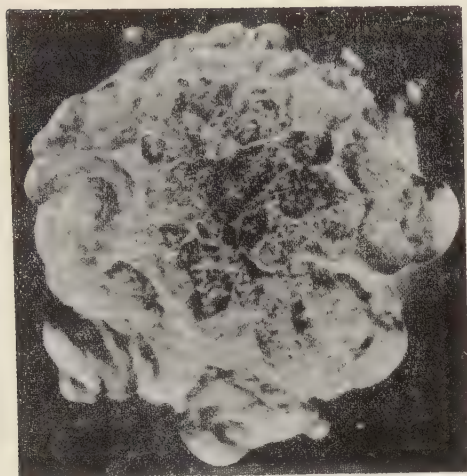
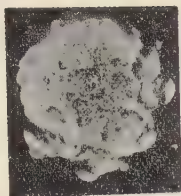


Fig. 2

Fig. 4

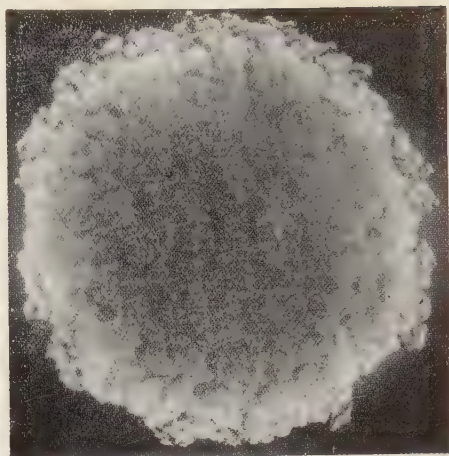
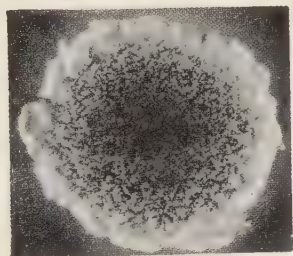


Fig. 3

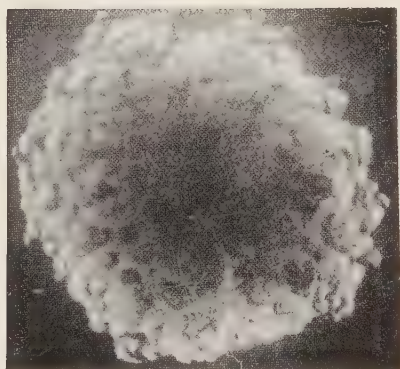


Fig. 5

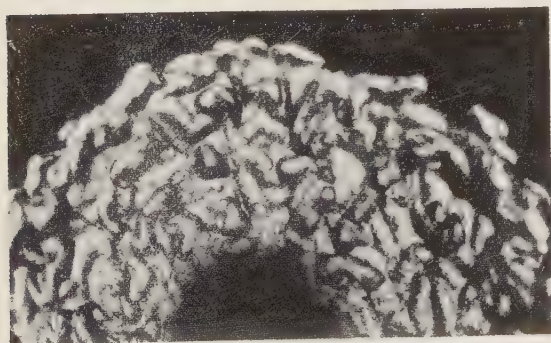


Fig. 6

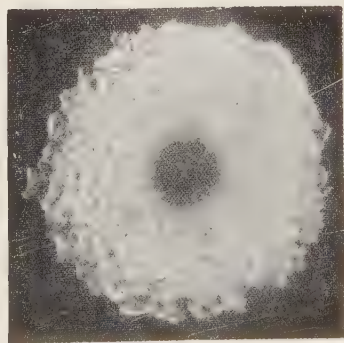


Fig. 7

Extrait du Fascicule X - 1937
des Travaux du Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

PLANCHE IV

Fig. 1. — Installation actuellement (1938) utilisée pour mesurer la conductibilité des liquides.

A. — Boîte de résistances à contact dual construite par TINSLEY.

B. — Deuxième voltmètre.

C. — Thermostat électrique.

D. — Voltmètre amplificateur.

E. — Générateur B. F. Hétérodyne.

F. — Pont construit par CHAIX.

Fig. 2. — Générateur B. F.

Fig. 3. — Voltmètre amplificateur.

— : —

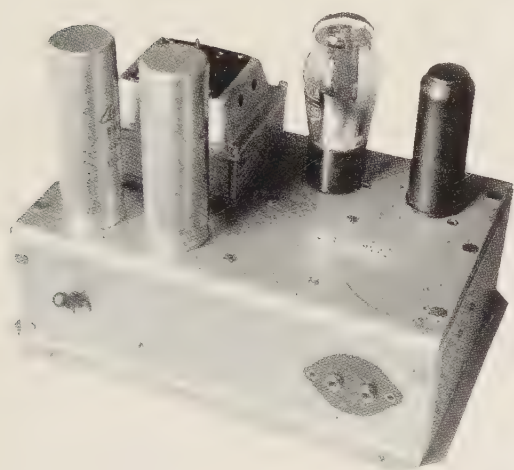
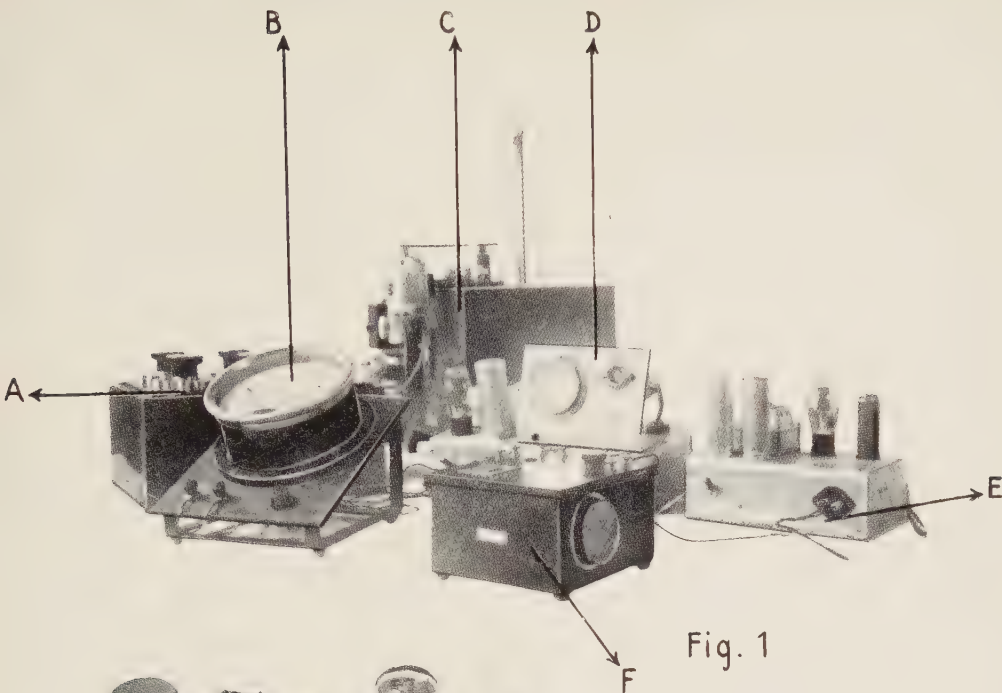
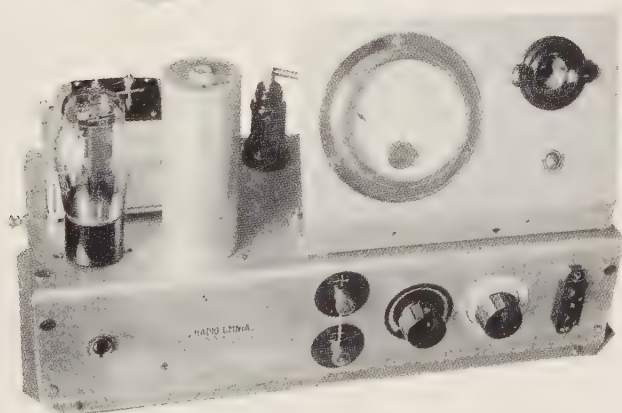


Fig. 3



INDEX BIBLIOGRAPHIQUE



- ALBUS (W.-R.). — Effect. of surface tension on the growth of *Escheriria Coli*. *Journ. of Infections Diseases*, vol. 41, p. 211-214, (1927).
- ALMQUIST (E.). — Variation and life cycles of pathogenic Bacteria. *Journ. of Infections Diseases*, 1921-31, p. 483, (1922).
- ALMQUIST (E.). — Biologische Forschungen über die Bakterien. *Norstedt et Söner*, Stockholm, 1925.
- AMBROZ. — *Zentralblatt f. Bakter*, Abt. I, Bd. 51, p. 193, (109).
- AMBROZ. — Entwicklungs zyklus des *Bacillus nitri* sp. nov., als Beitrag zur Zytologie der Bakterien. *Zentralblatt f. Bakt.*, I, Abt. Originale, Bd. LI, S. 193, (1909).
- ARTUNDO (A.) et AUBEL (E.). — Oxydabilité et vitesse de croissance. *C. R. Société Biolog.*, t. CVIII, p. 1111-1112, (1931).
- ASCOLI. — Zur Morphologie der Bakterien und ihre Beziehung zur Virulenz. *Deutsche med. Wochenschr.*, n° 20, S. 313, (1901).
- AUBEL (E.) et AUBERTIN (E.). — Sur le potentiel d'oxydo-réduction des milieux où croissent les anaerobies stricts et les anaerobies facultatifs. *C. R. Sté. Biolog.*, t. XVCII, pp. 1729-1730, (1927).
- BABES. — Ueber isoliert färbbare Anteile der Ba terien. *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. V, (1889).
- BACH. — (Note présentée par R. Fabre.) Les donateurs d'Hydrogène pour le *Pneumocoque*. *C. R. Sté. Biolog.*, t. CXXII, pp. 558-560, (1936).
- BACH et DELETANG. — *C. R. Sté. Biolog.*, t. CVII, pp. 666-668, (1931).
- BARY (A. de) — Ueber die Fruchtentwicklung der *Ascomyceten*. *Wilhelm Engelmann, Leipzig*, (1863).
- Vergleichende Morphologie und Biologie des Pilze, Mycetocoen und Bakterien. *Wilhelm Engelmann, Leipzig*, (1884).
- Vorlesungen über Bakterien. *Wilhelm Engelmann, Leipzig*, (1884).
- Vorlesungen über Bakterien, II. Aufl. *Wilhelm Engelmann, Leipzig*, (1887).
- BECHHOLD. — *Zeitschrift f. Hyg.*, Bd. 77, pp. 436-459, (1934).
- *Kolloid. Zeitschr.*, Bd. 25, Heft 4, pp. 158-161, (1919)
- *Münch. Med. Wochenschr.*, n° 29, (1924); n° 36, pp. 1149-1151, (1923); n° 39, pp. 1625-1626, (1925).
- *Gesundheits-Ingenieur*, tirage à part (1926); *Zeitschrift f. d. Ges. Exp. Medizin*, Bd. 26, Heft 5/6, pp. 543-561 (1927).
- *Zeitschrift f. Hyg.*, Bd. 112, Heft 3, pp. 414-420 (1931).

- BEGUET (M.). — Hypothèses sur le rôle de la pression osmotique dans les phénomènes microbiens. *Archives Inst. Pasteur d'Algérie*, 5, fascic. I, 25-31, (1927).
- BEIJERINCK. — Ueber Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. *Zentralblatt f. Bakt.*, I Abt., Bd. XIV, S. 844 (1893).
- BENOIT (M.). — Thèse doctorat Pharmacie, Nancy, (1935).
- BIDZINSKI (S.). — Thèse Pharmacie, Nancy, (1926).
- BLAU (O.). — Ueber die Temperaturmaxima der sporenkeimung und der sporenbildung sowie die supramaximalen Tötungszeiten der sporen der Bakterien, auch derjenigen mit hohen Temperaturminima. *Diss. der Universität Marburg* (1905), auch *Zentralblatt f. Bakt.*, Abt. II, Bd. XIV.
- BOHN (G.). et DRZEWINA (A.). — *C. R. Soc. Biolog.*, t. LXXXIX, pp. 386-388, (1923).
- BOUTARIC. — Les Colloïdes et l'état colloïdal (*Alcan, Paris*, 1931).
- Sur le coefficient de variation thermique de la tension superficielle des liquides. *Journal de Chimie Physique*, t. 31, pp. 621-627, (1934).
- BOTEZ. — Contribution à l'étude de la coloration vitale au violet de méthyle. *C. R. Soc. Biol.*, (1921), 2, p. 583.
- BRAUN (H.) et GUGGENHEIM (K.). — Ueber Atmungstypen bei fakultativ aeroben pathogenen Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Abt. I, Originale, Bd. 127, Heft 1/3, pp. 97-104, (1932).
- BRAUN (H.) et VASARHELYI (J.-V.). (Frankfurt a. M.). — Ueber die oxydierenden und reduzierenden Fähigkeiten der *Proteus*-bazillen und über die Beeinflussung dieser Fermentwirkungen durch Antikörper und Antiseptika. *Zentralblatt für Bakteriologie*. Abt. I, Originale, Bd. 127, Heft 1/3, pp. 105-111, (1932).
- BREDEMANN (G.). — Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögens des *Bacillus arterosporus* A. M., ausgeführt an 27. Stämmen verschiedener Herkunft. Ein Beitrag: zur Speziesfrage der Bakterien. *Zentralblatt f. Bakteriologie* Abt. II, Bd. XXII, 1908 a, S. 44-89.
- *Bacillus amylobacter* A. M. et BREDEMANN in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung, mit besonderen Berücksichtigung des stickstoffbindungsvermögens dieser Spezies. *Dissert., Marburg*, 1908, auch erschienen in *Zentralblatt f. Bakt.*, Abt. II, Bd. XXIII, (1909).
- BREFELD. — Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 9, (1891).
- BROWN-FRED EDWIN. — A study of the quantitative reduction of méthylène by Bacteria found in milk and the use of this stain in determining the Keeping quality of milk. *Zentralblatt f. Bakt.*, II, t. XXXV, (1912).
- BUNGE. — Ueber sporenbildung und Bakterien. *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. 5, (1889).
- BÜTSCHLI (O.). — Protozoa. Browns Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Bd. 1 (1880-87).

- CHANOZ (M.) et CLUZET (G.). — Conductibilité électrique et viscosité des dissolutions aqueuses. Drainage inégal des ions constituants; t. C, pp. 1205-1207, (1929).
- Conductibilité électrique de l'alcool éthylique pur et de ses dilutions aqueuses; t. XCIX, pp. 1999-2001 (1928).
- CLUZET (G.), ROCHAIX (A.) et KOFMANN (Th.). — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIX, pp. 1039-1040, (1923).
- COOPER et MASON. — Further investigations on selective bactéricidal actions. *J. Path. Bact.*, t. 31, p. 343 (1928).
- COUDRAY. — Thèse Faculté de Pharmacie, Nancy, (1929).
- DARMOY (G.). — *Conférences du Laboratoire de Microbiologie de Nancy*, fascicule I, (1930).
- DAY (A.) and William MERRIOT GIBBS. — Surface tension in relation to bacterial Growth; *Journal of Infections Diseases*; vol. 43, pp. 97-107 (1928).
- DOUMER (E.) et DOUMER (Edm.). — Loi de l'abaissement de la tension superficielle de l'eau distillée par le glycocholate de sodium, p. 393; Action du chlorure de sodium sur la tension superficielle des dissolutions aqueuses de glycocholate de sodium, p. 595; Tension superficielle des solutions de chlorure de sodium dans l'eau distillée, p. 681; Action secondaire des fortes concentrations de chlorure de sodium sur la tension superficielle des solutions de glycocholate de sodium, p. 683. *C. R. Soc. Biol.* 84, (1921).
- DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, t. III, p. 151. Czapek, *Biochimie der Pflanzen*, Jena, Bd. I, S. 145.
- DUPAIX (A.). — Thèse Faculté de Pharmacie, Nancy, pp. 61-143-155, (1933). *Librairie Le Français*.
- EHRLICH. — Färbung der Tuberkelbazillen. *Deutsche Med. Wochenschrift*, 1882).
- EISENBERG. — Studien zur Ektoplasmatheorie, I. Teil; Ueber die Kapselbildung beim *Milzbrandbazillus*. *Zentralblatt für Bakt.*, I Abt., Bd. XLVII, Originale, S. 415, (1908).
- ELLIS. — Beiträge zur Kenntnis der *Coccaceen* und *Spirillaceen*. I. Untersuchung über *Sarcina Streptococcus* und *Spirillent*. *Zentralbl. f. Bak.*, I Abt., Originale, Bd. XXXIII, S. I, (1902).
- II. Der Nachweis der Geißeln bei allen *Coccaceen*. *Zentralblatt f. Bak.*, I Abt., Beide vereint im Sparatabzug, S. I, 53, (1902-1903). Auch Dissertation, Marburg, (1902).
- ERNST. — Ueber Kern und Sporenbildung und Bakterien. *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. V, (1889).
- FISCHER (A.). — Bakterienwachstum bei O; sowie über das Photographieren von Kulturen leuchtender Bakterien in ihrem eigenem Lichte. *Zentralblatt f. Bak.*, Bd. IV, S. 89, (1888).
- Die Plasmolyse der Bakterien. *Ber. d. kgl. gesellsch. d. Wissenschaften, mathem. phys. Klasse, Sitzung am 2. März* (1891).

- Ueber die Geisseln einigen *Flagellaten*. *Pringsh. Jahrb. f. wissenschaftl. Bot.*, S. 187, (1894).
- Ueber Plasmolyse der Bakterien. *Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch.*, Bd. XXIV, Heft 2, S. 55, (1906).
- FUHRMANN (F.). — Zur Kenntnis der Bakterienflora des Flaschenbieres. *Zentralbl. f. Bakt.*, II Abt., Bd. XVI, S. 309, (1906).
- GASSEI (J.). — Culture du *Bacille typhique* sur milieux nutritifs colorés. *Archives de médecine expériment.*, t. II, p. 750, (1890).
- GENEVOIX et NICOLAIEV. — Potentiel d'oxydoréduction de la fermentation lactique bactérienne.
- GEORGEVITCH (P.). — Note préliminaire sur la formation et la germination des spores chez *B. Thermophilus* JIVOINI, nov. spec. (1910).
- GIRARD (P.). — A propos de l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 84, p. 443, (1921).
- GORBACH (G.). — *Arch. f. Mikrob.*, Bd. I, Heft 4, pp. 537-576, (1930).
- *Arch. f. Mikrob.*, Bd. I, Heft 3, pp. 368-380, (1930).
- Zur Kenntnis des Farbstoffes des *Bacillus prodigiosus*; II. Mitteilung. Das optische Verhalten des Prodigiosins.
- GORINI. — Ueber die schwarzen pigmentbildenden Bakterien. *C. R. f. Bak.*, I Abt., Bd. XX, (1896).
- Mutations physiologiques brusques chez les ferments lactiques par divergences individuelles. *C. R. Acad. Sciences*, t. 172, p. 1382, (1921).
- GOTSCHLICH. — Die Variabilität der Mikroorganismen in allgemein biologischer Hinsicht; Bericht über die X. Tagung Deutscher Vereinigung für Mikrobiologie von 12-14 juin (1924). *Göttingen*.
- Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen; I. *Variabilität der pathogenen Bakterien-Handbuch der pathog. Mikroorganismen*, Bd. I, S. 206-249 (1927).
- Allgemeine Morphologie und Biologie der pathog. Mikroorganismen; In *Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und Wassermann*, Bd. I, Jena-Fischer, (1903).
- Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen; *Handbuch der pathog. Mikroorganismen.*, Kolle, Kraus, Uhlenhuth., Bd. 1, Lfg. 13 - Lfg. 12, (1927).
- GOTTHEIL (O.). — Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. *Zentralblatt f. Bakt.*, II Abt., t. VII, S. 430, (1901).
- Arb. a. d. Bot. Inst. zu Marburg. Auch Dissertation Marburg, 1902.
- GRAM (C.). — *Fortschr. der Medizin.*, Bd. 2, n° 6, pp. 185-189, (1884).
- GRIMME. — Die Wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihren Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. *Inaug. Dissert.*, Marburg, 5. März 1902. Auch mit Abbildungen im *Zentralblatt f. Bakt.*, I Abt., Bd. XXXII, (1902).
- GUILLIERMOND (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXIV, pp. 651-652, (1913).
- Contribution à l'étude cytologique des Bactéries. *C. R. S.*, 1285, (1896).
- Sur la présence des corpuscules métachromatiques dans les Bactéries. *Extr. du Lyon Médical*, n° du 3 juillet (1902).

- Recherches cytologiques sur les *Levures*. Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences de Paris, Lyon, 1902. (Résumé dans la *Revue générale de Botanique*, 1903.)
- Contribution à l'étude cytologique des Bacilles endospores. *Archiv. f. Protistenkunde*, Bd. XII, S. 9, (1908).
- A propos des corpuscules métachromatiques ou grains de volutine. *Archiv. f. Protistenkunde*, Bd. XIX, S. 289, (1910).
- HADLEY. — Microbic dissociation. The instability of bacterial species with special reference to active dissociation and transmissible autolyses. *Journ. of Infect. diseases.*, 40, n° 1.
- HAUDUROY. — Importance scientifique et pratique d'une nomenclature internationale des Bactéries. *Presse médicale*, n° 49, pp. 965-966.
- HISCOX (E.-B.), HOY (W.-A.), LOMAX (K.-L.) and MATTICK (A.-T.-R.). — The Bacteriological examination of milk. I. Modification of the agar plate-count method. II. The use of the methylene blue reductase test at 15,5° C. as a method of determining the keeping quality of milk. *The Journal of Dairy Research.*, vol. IV, n° 1, pp. 105-121, (1932).
- HOLLANDE (A.-C.) et CREMIEUX (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, pp. 542-544, (1928).
- HOLZMÜLLER — Die Gruppe des *Bacillus mycoides* FLÜGGE. *Zentralblatt f. Bakt.*, Bd. XXIII, 2. Abt., (1909).
- JAVILLIER. — Les ferments proteolytiques. Etude chimique et pharmacotechnique. 1 vol. in-8°, p. 250, Vigot frères, Paris, (1909).
- JOYET et LAVERGNE (Ph.). — La recherche des zones d'oxydation dans la cellule végétale. *C. R. Soc. Biol.*, t. CX, pp. 918-920, (1932).
- KOCH (R.) — Ueber neue Tuberkulinpräparate. *Deutsche med. Wochenschrift*, (1897).
- KOHL. — Beiträge zur kenntnis der Plasmaverbindungen in den Pflanzen. *Beihefte z. Bot. Zentralbl.*, Bd. XII, S. 343, (1902).
- KOLLE (KOLLE und WASSERMANN). — Handburch der Mikroorganismen. *Jena*, Gustav Fischer, Bd. I (1903, II), Bd. II (1903, II), Bd. III (1903, III), Bd. IV (1904).
- KOPACZEWSKI (W.). — Tension superficielle en Biologie. I. La tension superficielle et sa mesure; un nouveau tonomètre. *Archives de Physique biologique*, t. I, n° 4, pp. 145-167, (1921).
- II. Le rôle de la tension superficielle dans les phénomènes de choc par contact. *Archives de Physique biologique*, t. II, n° 2, pp. 1-20, (1922).
- Rôle de la tension superficielle en Biologie. *Protoplasma*, t. XIX, n° 2, pp. 255-292, (1933).
- Tension superficielle en Biologie. *C. R. Soc. Biol.*, t. 91, pp. 402-404, (1924).
- Traité de Biocolloïdologie. Gauthier-Villars, Paris, t. I, fasc. 3, pp. 401-460, (1930).
- KRÆNIG et PAUL. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XXV, p. 1, (1897).

- KROMPECHER. — Untersuchungen über das Vorkommen metachromatischer Körnchen bei sporentragender Bakterien und Beiträge zur Kenntnis der Babes-Ernstchen Körperchen. *Zentralbl. f. Bakt.*, Bd. XXX, (1901).
- LANKESTER. — On a peach coloured Bacterium. *Bact. rubescens*. *Quart. Jour. of microc. Science*, vol. XII, new. ser., p. 408 (1873).
- LASSEUR (Ph.). — Thèse Faculté des Sciences, Nancy (1911).
— Observations sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries; Recueil publié à l'occasion du Jubilé scientifique du Professeur G. LE MONNIER, Berger-Levrault, Nancy, pp. 104-105 (1913).
- LASSEUR (Ph.) et GIRARDET (F.). — L'eau pure en Biologie; *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, t. VI, pp. 314-325 (1924).
- LASSEUR (Ph.), GIRARDET (F.) et VERMELIN (H.). — Constante physico-chimique des sérums, I Variations de la conductibilité électrique avec la dilution; *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, t. VII, n° 3, pp. 401-418 (1925).
- LASSEUR (Ph.) et SCHMITT. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XLI, pp. 554-576 (1927).
- LASSEUR (Ph.) et NOBLAT (A.-M.). — Conductibilité des suspensions bactériennes; *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. I, pp. 45-55 (1928).
- LASSEUR (Ph.), OLIVIER (M.), DUPAIX (A.) et MAGUITOT (C.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. III, pp. 67-74 (1930).
- LASSEUR (Ph.) et SERRA (J.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. IV, pp. 133-136 (1931).
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et MARCHAL (J.-G.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. IV, p. 63 (1931).
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — Observations sur le mécanisme du phénomène de CHARRIN et ROGER. — Variations de quelques paramètres dans l'agglutination sérique des Bactéries; *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. V, pp. 167-204 (1932).
- LASSEUR (Ph.), FRIBOURG (R.) et GROJEAN (M.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. IV, pp. 121-132 (1932).
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX et GEORGES (L.). — Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des Bactéries cultivées sur milieu synthétique et en solution peptonée; *Archiv. f. Mikrobiologie*. Bd. 34, Heft 5, pp. 561-579 (1932).
- LASSEUR (Ph.), JOUAVILLE (M.), DUPAIX (A.) et MARCHAL (J.-G.). — Mesure de conductibilité et du voltmètre amplificateur, pp. 41-48; *Bulletin de l'Association des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, n° 6, mai (1933).

- LASSEUR et C. MARION. — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. X, p. 30 (1937).
- LECOMTE DU NOUY (P.). — Equilibres superficiels des solutions colloïdales; Masson, éd. Paris (1929).
- LESBRE (Ph.) et JANSION (H.). — Pouvoir réducteur des *Staphylocoques* vis-à-vis du bleu de méthylène: ses rapports avec la virulence; *C. R. Soc. Biol.*, t. XCIV, pp. 586-588 (1926).
- LUNDQUIST (W.) et RYLANDER (G.) (présenté par C. KLING). — Méthode perfectionnée pour l'étude du pouvoir réducteur des Bactérie; *C. R. Soc. Biol.*, t. XCV, p. 1516 (1926).
- MALFITANO (G.). — De l'appréciation du pouvoir gélatinolytique; *C. R. S. Biol.*, t. 55 (1903), pp. 845-847.
- Sur la dissociation du pouvoir albuminolytique et du pouvoir gélatinolytique de la protéase charbonneuse; *C. R. S. Biol.*, t. 55, pp. 843-845 (1905).
- La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*; *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIV, pp. 60-420 (1900).
- Tubes de Mett d'albumine et de gélatine gradués et stériles; *C. R. Soc. Biol.*, t. LVI, p. 33 (1904).
- MALFITANO (G.) et LAZARUS (E.). — Influence de la concentration en peptone des milieux sur le pouvoir protéolytique de la bactérie charbonneuse (1907).
- MALFITANO (G.) et STRADA (F.). — Evolution du pouvoir protéolytique des bactéries du charbon; *C. R. Soc. Biol.*, t. LVII, pp. 18-120 (1905).
- MARCHAL (J.-G.). — Contribution à l'étude de la variation en Microbiologie. Thèse Doctorat ès sciences, Nancy (1932).
- MAYER (A.) et NICHITA (G.). — Sur l'action hyperthermisante et oxydoréductrice du bleu de méthylène; *C. R. Soc. Biol.*, t. CI, pp. 863-684 (1929).
- MEYER (A.). — Über die Knollen der einheimischen Orchideen. *Arch. d. Pharmazie* (1887).
- MAZÉ (P.) et P.-J. MAZÉ fils. — Les substances réductrices du lait assurent le développement prédominant de la fermentation lactique dans le lait. L'action de l'oxygène libre sur les ferments lactiques se développant en anoérobiose; *C. R. Soc. Biol.*, t. CV, pp. 518-520 (1930).
- MESSNER (E.). — Contribution à l'étude de l'influence de la température sur la conductibilité du lait; t. CXVII, pp. 897-899 (1934).
- MIGULA (W.). — System der Baktérien. Bd. I, Fischer, Jena (1827).
- MINOU (M.). — Thèse Doctorat Pharmacie, Nancy (1927).
- Considérations générales sur la forme des Bactéries. Paul Nogué, Bergerac (1927).
- MOLISCH (H.). — Über ultramikroorganismen *Bot. Ztg.*, S. 131 (1908).
- MÜHLSCHLEGEL. — Über die Bildung und den Bau der Bakteriensporen, *Zentralblatt f. Bakt., II Abt.*, Bd. VI, S. 65 (1900).
- NADSON. — Observations sur les Bactéries pourprées. *Bef. un Bot Zentralbl.*, Bd. XCVI, S. 90 (1904).
- NÆGELI. — Untersuchungen über niedere Pilze (1877-78).

- NAKANISHI. — Über den Bau der Bakterien. *Zentralbl. f. Bakt.*, Bd. XXX (1901).
- NEIDE. — *Zentralbl. f. Bakteriologie*, Bd. XXXV, 1 Abt., pp. 508-521 (1904).
— Botanique Beschreibung einiger sporenbildenden Bakterien. *Zentralbl. f. Bakt. originale*, t. XCVII (1926).
- NEPVEUX. — Thèse Doctorat Pharmacie Nancy (1920).
- NETTER (A.), ANDRÉ, CESARI, COTONI. — Action du ricinoléate de sodium sur les Bactéries et les toxines; *C. R. Soc. Biol.*, t. XCVI, pp. 183-186 (1927).
- PALGEN (W.). — Thèse Doctorat Pharmacie Nancy (1920). Essai sur la Biologie de quelques Bactéries.
- PETRAGNANI (G.). — La dissociation bactérienne, *Boll. del sez. ital. Soc. int. Microbiol.*, t. X, p. 44.
- PLOTZ (H.) et GELASO. — Relation entre la croissance des microorganismes anaérobies et le potentiel du milieu de culture; *C. R. Soc. Biol.*, t. CIV, n° 26, pp. 1210-1212 (1930).
- QUASTEL et WOOLDRIDGE (W.-R.). — Dehydrogenation produced by resting Bacteria; *I, II Biochem J.*, t. XIX, pp. 520-645 (1925); *III Biochem J.*, t. XIX, p. 652 (1925).
- ROLIN. — Thèse Doctorat Pharmacie, Nancy (1929).
- ROSENTHAL (L.). — Sur la production de bactériodites charbonneuses asporogènes par un procédé nouveau; *C. R. Soc. Biol.*, t. XCV, p. 445 (1926).
- RUZICKA. — *Arch. f. Hyg.*, Bd. 51, pp. 281-318 (1904).
- SACHSE (R.), de Munich. — La conductibilité électrique au service de la Bactériologie; *Mikrosmos* (1913), 14, VII, Heft, 12.
- SCHAFER (J.-M.) and TILLEY (F.-W.). — Germicidal efficiency of soaps and of mixtures of soaps with sodium hydroxide or with phenols; *Journal of Agriculture Research*, vol. XLI, n° 10, pp. 737-747 (1930).
- SWELLENGREBEL (N.-H.). — Untersuchungen über die Zytologie einiger Fadenbakterien. *Arch. f. Hyg.*, Bd. LXX, S. 380.
— Zur Kenntnis der Zytologie von *Bacillus maximus buccalis* (MILLER). *Zentralblatt f. Bakt.*, II Abt; Bd. XVI, n° 20/21, S. 617 (1906).
— Zur Kenntnis der Zytologie der Bakterien. *Zentralbl. f. Bak. usw.*, II Abt., Bd. XIX, n° 7/9, S. 193 (1907).
— Sur la Cytologie comparée des *Spirochètes* et des *Spirilles*. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, Juillet 1907.
— Neuere untersuchungen über die vergleichende Zytologie der *Spirillen* und *Spirochäten*. *Zentralbl. f. Bakt.*, I Abt. *Originale* Bd. XLIX, Heft 4, S. 529 (1909).
- SERRA (J.). — Thèse Faculté des Sciences, Nancy (1932).
— *Bulletin Assoc. des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, n° 2 (1931).
- STRAUSS. —
- THIRY (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXIV, pp. 651-652 (1913).
- TILLEY (F.-W.) et SCHAFER (J.-M.). — *Journ. of agric. research*, vol. XLIII, n° 7, pp. 611-617 (1931).

- TILLEY (F.-W.) et SCHAEFFER (J.-M.). — *Journ. of. infections diseases*, 37, 359 (1925).
- VELLUZ (L.). — Remarques sur les propriétés cryptotoxiques générales des savons; *C. R. Soc. Biol.*, 105-634 (1930).
- VINCENT (H.). — Sur quelques propriétés générales des cryptotoxines; *C. R. Soc. Biol.*, t. CIX, pp. 15-17 (1932).
- Immunologie. Nouvelles recherches sur les cryptotoxines. Le phénomène de sursaturation des toxines par l'ion salicylique; *C. R. Acad. Sciences* 193, 620 (1931).
- WÆLE (H. de). — Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes; *Zentralbl. f. Bakt. Orig.*, t. L, pp. 40-44 (1909).
- WÆLE (H. de) et VANDEVELDE (A.-J.-J.). — Sur les ferments protéolytiques des microbes et une méthode d'évaluation quantitative de la liquéfaction de la gélatine, *Zentralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig., Bd. XXXIX, pp. 353-357.
- WURMSER (R.). — Sur l'emploi de certains colorants pour l'évaluation des propriétés oxydantes du cytoplasme; *C. R. Soc. Biol.*, t. CXI, pp. 690-692 (1932).
- WURMSER (R.) et GÉLOSO (J.). — Sur les potentiels d'oxydo-réduction intracellulaires, t. CIV, pp. 135-138 (1930).
- WYSS (F.), CHODAT et CHODAT (Fernand). — Les déshydrogénases au cours de la lyse du *B. coli*; *C. R. Soc. Biol.*, t. CXVI, p. 14 (1934).
- ZSYGMONDI. — *Traité de Chimie colloïdale*. Dunod, éditeur, Paris (1926).
-

Vu:

Nancy, le 19 octobre 1938.

Le Président de thèse,

Ph. LASSEUR.

VU ET APPROUVÉ:

Nancy, le 19 octobre 1938.

Pour le Doyen de la Faculté de Pharmacie:

L'Assesseur: Ph. LASSEUR.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

Nancy, le 19 octobre 1938.

Le Recteur de l'Académie,

L. BRUNTZ.

Président du Conseil de l'Université.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.	7
-----------------------	---

AVANT-PROPOS.	13
-----------------------	----

CHAPITRE PREMIER

Dimensions de la plastide.	17
------------------------------------	----

CHAPITRE II

Etude de la vitesse de décoloration.	27
--	----

CHAPITRE III

Sporulation et germination.	33
-------------------------------------	----

CHAPITRE IV

Etude de la protéolyse du lait par les trois types dissociés de <i>B. lactis niger</i> GORINI.	49
--	----

CHAPITRE V

Protéolyse de la gélatine par les trois types dissociés de <i>B. lactis niger</i> GORINI.	51
---	----

CHAPITRE VI

Influence du pH sur la végétation des trois types dissociés de <i>B. lactis niger</i> GORINI.	57
---	----

CHAPITRE VII

Influence des antiseptiques sur la végétation de trois types dissociés de <i>B. lactis niger</i> GORINI.....	67
--	----

CHAPITRE VIII

Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie de trois types de <i>B. lactis niger</i> GORINI, cultivés en milieu synthétique.	81
---	----

CHAPITRE IX

Potentiel d'oxydo-réduction de trois types dissociés....	91
--	----

CHAPITRE X

Conductibilité des suspensions bactériennes.	97
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	103
PLANCHES.	104
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	105
